

NASÁRIDOS COMO ORGANISMOS MODELO EN EL ATLÁNTICO NORDESTE: IMPOSEX Y ESTRUCTURA DE POBLACIONES

Lucía Couceiro López
Abril de 2008



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTADE DE CIENCIAS



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA ANIMAL, BIOLOXÍA VEXETAL E ECOLOXÍA

NASÁRIDOS COMO ORGANISMOS MODELO EN EL ATLÁNTICO

NORDESTE: IMPOSEX Y ESTRUCTURA DE POBLACIONES

Memoria presentada por
Dña. LUCÍA COUCEIRO LÓPEZ
para optar al grado de Doctora en Biología

A Coruña, Abril de 2008



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULDADE DE CIENCIAS

D. RODOLFO BARREIRO LOZANO y **D. JOSÉ MIGUEL RUIZ DE LA ROSA**, profesores catedrático y titular, respectivamente, de Ecoloxía del Departamento de Bioloxía Animal, Bioloxía Vexetal e Ecoloxía de la Facultade de Ciencias de la Universidade da Coruña.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada: **"Nasáridos como organismos modelo en el Atlántico nordeste: imposex y estructura de poblaciones"** presentada por **Dña. LUCÍA COUCEIRO LÓPEZ** para optar al **Grado de Doctora en Biología** ha sido realizada bajo su dirección. Asimismo, consideran que dicho trabajo está en condiciones de ser defendido ante el tribunal que deberá juzgarlo.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en A Coruña a 25 de Abril de 2008.

Dr. Rodolfo Barreiro Lozano

Dr. José Miguel Ruiz de la Rosa



À memória de Sergio



La financiación de este trabajo ha sido posible gracias a los siguientes proyectos de investigación:

Capacidad de respuesta de poblaciones de gasterópodos marinos frente al TBT estudiada con técnicas de ecología molecular (Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento; Xunta de Galicia; PGIDT01MAM10301PR)

Capacidad de respuesta de poblaciones de gasterópodos marinos frente al TBT estudiada con técnicas de ecología molecular (Ministerio de Ciencia y Tecnología; REN2001-0899)

Evaluación avanzada y actualizada de la presencia y efectos del TBT en aguas costeras gallegas (Ministerio de Educación y Ciencia; CTM2004-04496)

Evaluación avanzada y actualizada de la presencia y efectos del TBT en aguas costeras gallegas (Consellería de Innovación, Industria e Comercio; Xunta de Galicia; PGI DIT05PXIC10302PN)

Seguimiento de los efectos biológicos específicos del TBT para cumplir con OSPAR (Universidade da Coruña)

Asimismo, la autora agradece la concesión de una **Beca del Programa Nacional de Formación del Profesorado Universitario (FPU)** durante el periodo 2003-2006 (AP2002-0928).



Despois de tantos meses sentada diante deste ordenador, é de supoñer que a miña capacidade para transmitir ideas debería ter mellorado bastante. Sen embargo, sei que nunca atoparei as palabras axeitadas para expresaros todo o meu agradecemento.

Aos meus directores, Chemy e Rodolfo. Porque, anos antes de que esta tese fose só un proxecto, espertastes en min o interese pola Ecoloxía e pola ciencia en xeral. Por acollerme no voso grupo durante dous veráns e brindarme despois a oportunidade de facer parte del. Por todos os bos momentos que pasamos e, tamén, pola proximidade e comprensión nos días malos. Por ter convertido estes anos nos máis importantes da miña vida.

A María. Por terme guiado polos camiños da ciencia e da vida. Tamén aquí, ao igual que nas nosas conversas, sobran as palabras. Por moitos quilómetros que nos separen, ruliña, ti sempre estarás moi preto do meu corazón.

A Carlos Caramelo. Por estar sempre disposto a botarme unha man ou a percorrer a costa galega comigo. Tamén por todas esas conversas acompañadas de café e/ou tabaco.

A Sirka, Andreea e as nenas de botánica.

Aos meus pais, a quen lles debo todo o que son. Polo voso apoio incondicional. Por non ter escatimado nunca esforzos na miña educación académica e, tamén, na que se recibe na casa e nos forma coma persoas.

A Xulio Antón, Alicia, Emma e Mariña. Por estar sempre aí.

A Iván. Por facer que a vida sexa marabillosa.

A Coruña, 23 de abril de 2008



ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL	1-60
1. DISPERSIÓN Y FLUJO GENÉTICO EN MEDIO MARINO	7
1.1. IMPORTANCIA Y APROXIMACIONES TRADICIONALES A SU ESTUDIO	7
1.2. APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES AL ESTUDIO DE LA DISPERSIÓN	8
1.3. TÉCNICAS MOLECULARES EMPLEADAS EN ESTA MEMORIA	11
1.3.1. ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO ALEATORIAMENTE (RAPD)	11
1.3.1.1. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS MARCADORES RAPD	12
1.3.1.2. APLICACIONES DE LA TÉCNICA RAPD	14
1.3.2. ADN MITOCONDRIAL	15
1.3.2.1. TÉCNICAS EMPLEADAS EN ESTUDIOS DE ADN MITOCONDRIAL	17
1.3.2.2. UNA NUEVA DISCIPLINA CIENTÍFICA: LA FILOGEOGRAFÍA	18
2. CONTAMINACIÓN POR TRIBUTOLO DE ESTAÑO (TBT)	20
2.1. EL PROBLEMA DE LA BIOINCRUSTACIÓN Y SU PREVENCIÓN	20
2.2. LOS DAÑOS COLATERALES DEL TBT	21
2.3. EL IMPOSEX EN GASTERÓPODOS MARINOS	23
2.3.1. PRIMERAS OBSERVACIONES ACERCA DEL IMPOSEX	23
2.3.2. EL IMPOSEX Y LA BIOMONITORIZACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR TBT	26
2.3.3. EXTENSIÓN GEOGRÁFICA Y TAXONÓMICA DEL IMPOSEX	30
2.3.4. DISRUPCIÓN ENDOCRINA Y EL MECANISMO DEL IMPOSEX	31
2.4. DEGRADACIÓN DEL TBT EN EL MEDIO MARINO	33
2.5. LEGISLACIÓN RELATIVA AL USO DEL TBT	34

3. <i>NASSARIUS RETICULATUS</i>: UN ORGANISMO MODELO EN EL ATLÁNTICO NORDESTE	37
3.1. BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE LA ESPECIE	37
3.2. VENTAJAS DE <i>NASSARIUS RETICULATUS</i> COMO ORGANISMO MODELO	42
3.2.1. <i>NASSARIUS RETICULATUS</i> Y EL ESTUDIO DE LA DISPERSIÓN	42
3.2.2. <i>NASSARIUS RETICULATUS</i> Y LA BIOMONITORIZACIÓN DEL TBT	43
4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
OBJETIVOS	61-64
CAPÍTULO 1: IMPOSEX Y BIOACUMULACIÓN DE ORGANOESTÁNNICOS EN POBLACIONES DE <i>NASSARIUS RETICULATUS</i> (L.) DE GALICIA (NO PENÍNSULA IBÉRICA): SITUACIÓN ACTUAL Y EVOLUCIÓN TEMPORAL (2000-2005)	65-122
1. INTRODUCCIÓN	69
2. OBJETIVOS	72
3. MATERIAL Y MÉTODOS	74
3.1. ESCALA GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO Y RECOGIDA DE LAS MUESTRAS	74
3.2. EVALUACIÓN DEL IMPOSEX	76
3.3. ANÁLISIS DE ORGANOESTÁNNICOS	78
4. RESULTADOS	81
4.1. INCIDENCIA DEL PARASITISMO Y PROPORCIÓN DE SEXOS	81
4.2. NIVELES DE IMPOSEX	83
4.3. NIVELES DE BUTILESTÁNNICOS (BTs) EN TEJIDOS	89
4.4. RELACIÓN ENTRE LOS ÍNDICES BIOLÓGICOS Y LA CONTAMINACIÓN	92
4.5. IMPOSEX Y TRIBUTILO DE ESTAÑO (TBT) EN LA COSTA GALLEGA: VARIACIÓN ESPACIAL	95
4.6. IMPOSEX Y BUTILESTÁNNICOS (BTs) EN LA COSTA GALLEGA: VARIACIÓN TEMPORAL	97
4.6.1 IMPOSEX	100
4.6.2 BUTILESTÁNNICOS (BTs)	100
4.6.3 RELACIÓN IMPOSEX – TRIBUTILO DE ESTAÑO (TBT)	104

5. DISCUSIÓN	106
5.1. UTILIDAD BIOINDICADORA DE LA ESPECIE	106
5.2. IMPOSEX EN <i>NASSARIUS RETICULATUS</i> <i>versus</i> CONTAMINACIÓN POR TBT	108
5.3. NIVELES ACTUALES DE CONTAMINACIÓN E IMPOSEX EN LA COSTA GALLEGA	110
5.4. TENDENCIA TEMPORAL	113
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
CAPÍTULO 2: ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DEL PROSOBRANQUIO <i>NASSARIUS RETICULATUS</i> (L.) EN LA COSTA DE GALICIA (NO PENÍNSULA IBÉRICA) REVELADA CON MARCADORES RAPD	123-164
1. INTRODUCCIÓN	127
2. OBJETIVOS	130
3. MATERIAL Y MÉTODOS	131
3.1. ESCALA GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO Y RECOGIDA DE LAS MUESTRAS	131
3.2. EXTRACCIÓN DEL ADN	132
3.3. REACCIÓN RAPD	133
3.4. ELECTROFORESIS Y VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS	135
3.5. ESTUDIO PILOTO E IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS RAPD	136
3.6. ANÁLISIS DE DATOS	137
3.6.1. DIVERSIDAD GENÉTICA	137
3.6.2. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y ESTRUCTURA GEOGRÁFICA	138
3.6.2.1. AMOVA	138
3.6.2.2. TEST DE MANTEL	141
3.6.2.3. ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS	142
3.6.2.4. ESCALAMIENTO MULTIDIMENSIONAL NO MÉTRICO	144
4. RESULTADOS	145
4.1. PERFILES RAPD EN <i>NASSARIUS RETICULATUS</i>	145

4.2. DIVERSIDAD GENÉTICA	146
4.3. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y ESTRUCTURA DE POBLACIONES	147
5. DISCUSIÓN	154
5.1. CONECTIVIDAD DEMOGRÁFICA DE LAS POBLACIONES	154
5.2. LAS RÍAS GALLEGAS Y EL INCREMENTO DE LA DIFERENCIACIÓN GENÉTICA	157
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	160
CAPÍTULO 3: AISLAMIENTO GENÉTICO POR DISTANCIA ENTRE POBLACIONES DE <i>NASSARIUS RETICULATUS</i> (L.) A LO LARGO DE LA COSTA ATLÁNTICA EUROPEA	165-208
1. INTRODUCCIÓN	169
2. OBJETIVOS	172
3. MATERIAL Y MÉTODOS	173
3.1. ESCALA GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO Y MUESTREO	173
3.2. EXTRACCIÓN DEL ADN	174
3.3. AMPLIFICACIÓN POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	175
3.4. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS	178
3.5. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS	178
3.6. ANÁLISIS DE DATOS	180
3.6.1. DETERMINACIÓN DEL MODELO DE EVOLUCIÓN DEL ADN	180
3.6.2. ESTIMAS DE DIVERSIDAD GENÉTICA	181
3.6.3. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y ESTRUCTURA GEOGRÁFICA	182
3.6.3.1. ANÁLISIS DE LA VARIANZA MOLECULAR (AMOVA) Y TEST DE MANTEL	182
3.6.3.2. RED HAPLOTÍPICA	183
3.6.4. DEMOGRAFÍA HISTÓRICA	184
4. RESULTADOS	186
4.1. ESTABLECIMIENTO DEL CONJUNTO DE DATOS	186
4.2. DIVERSIDAD GENÉTICA	187

4.3. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y ESTRUCTURA GEOGRÁFICA	189
4.4. DEMOGRAFÍA HISTÓRICA	192
5. DISCUSIÓN	195
5.1. CONECTIVIDAD DE LAS POBLACIONES	195
5.2. DEMOGRAFÍA HISTÓRICA	199
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	203
CAPÍTULO 4: PRESENCIA DE <i>CYCLOPE NERITEA</i> (L.) (GASTROPODA, PROSOBRANCHIA) EN EL NO DE LA PENÍNSULA IBÉRICA: ORIGEN Y GRADO DE IMPOSEX DE LAS POBLACIONES	209-240
1. INTRODUCCIÓN	213
2. OBJETIVOS	217
3. MATERIAL Y MÉTODOS	218
3.1. ESCALA GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO Y RECOGIDA DE LAS MUESTRAS	218
3.2. CONTAMINACIÓN POR TRIBUTO DE ESTAÑO (TBT) E IMPOSEX EN <i>CYCLOPE NERITEA</i>	219
3.3. ADN MITOCONDRIAL Y ORIGEN DE LAS POBLACIONES GALLEGAS DE <i>CYCLOPE NERITEA</i>	220
4. RESULTADOS	222
4.1. CARACTERÍSTICAS DEL IMPOSEX	222
4.2. INCIDENCIA DEL IMPOSEX	224
4.3. DIVERSIDAD GENÉTICA	228
4.4. COMPOSICIÓN HAPLOTÍPICA Y ESTRUCTURA GENÉTICA	228
5. DISCUSIÓN	232
5.1. CONTAMINACIÓN POR TRIBUTO DE ESTAÑO (TBT) E IMPOSEX EN <i>CYCLOPE NERITEA</i>	232
5.2. ADN MITOCONDRIAL Y ORIGEN DE LAS POBLACIONES GALLEGAS DE <i>CYCLOPE NERITEA</i>	235
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	238

CAPÍTULO 5: *DNA BARCODING* EN DOS ESPECIES MORFOLÓGICAMENTE SIMILARES DEL GÉNERO *NASSARIUS* DUMÉRIL: *NASSARIUS RETICULATUS* (L.) Y *NASSARIUS NITIDUS* (JEFFREYS) 241-264

1. INTRODUCCIÓN 245

2. OBJETIVOS 249

3. MATERIAL Y MÉTODOS 250

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y OBTENCIÓN DE SECUENCIAS COI EN *NASSARIUS NITIDUS* 250

3.2. ANÁLISIS DE DATOS 251

4. RESULTADOS 253

4.1. VARIACIÓN INTRA E INTERESPECÍFICA 253

4.2. LUGARES DE RESTRICCIÓN DIAGNÓSTICO 256

5. DISCUSIÓN 258

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 262

CONCLUSIONES GENERALES 265-268

ANEXOS 269-283

1. LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS 271

2. ÍNDICE DE TABLAS 275

3. ÍNDICE DE FIGURAS 279



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN GENERAL

1. DISPERSIÓN Y FLUJO GENÉTICO EN MEDIO MARINO

- 1.1. IMPORTANCIA Y APROXIMACIONES TRADICIONALES A SU ESTUDIO
- 1.2. APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES AL ESTUDIO DE LA DISPERSIÓN
- 1.3. TÉCNICAS MOLECULARES EMPLEADAS EN ESTA MEMORIA
 - 1.3.1. ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO ALEATORIAMENTE (RAPD)
 - 1.3.1.1. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS MARCADORES RAPD
 - 1.3.1.2. APLICACIONES DE LA TÉCNICA RAPD
 - 1.3.2. ADN MITOCONDRIAL
 - 1.3.2.1. TÉCNICAS EMPLEADAS EN ESTUDIOS DE ADN MITOCONDRIAL
 - 1.3.2.2. UNA NUEVA DISCIPLINA CIENTÍFICA: LA FILOGEOGRAFÍA

2. CONTAMINACIÓN POR TRIBUTOLO DE ESTAÑO (TBT)

- 2.1. EL PROBLEMA DE LA BIOINCRUSTACIÓN Y SU PREVENCIÓN
- 2.2. LOS DAÑOS COLATERALES DEL TBT
- 2.3. EL IMPOSEX EN GASTERÓPODOS MARINOS
 - 2.3.1. PRIMERAS OBSERVACIONES ACERCA DEL IMPOSEX
 - 2.3.2. EL IMPOSEX Y LA BIOMONITORIZACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR TBT
 - 2.3.3. EXTENSIÓN GEOGRÁFICA Y TAXONÓMICA DEL IMPOSEX
 - 2.3.4. DISRUPCIÓN ENDOCRINA Y EL MECANISMO DEL IMPOSEX

2.4. DEGRADACIÓN DEL TBT EN EL MEDIO MARINO

2.5. LEGISLACIÓN RELATIVA AL USO DEL TBT

3. *NASSARIUS RETICULATUS*: UN ORGANISMO MODELO EN EL ATLÁNTICO NORDESTE

3.1. BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE LA ESPECIE

3.2. VENTAJAS DE *NASSARIUS RETICULATUS* COMO ORGANISMO MODELO

3.2.1. *NASSARIUS RETICULATUS* Y EL ESTUDIO DE LA DISPERSIÓN

3.2.2. *NASSARIUS RETICULATUS* Y LA BIOMONITORIZACIÓN DEL TBT

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

"Animals living in the waters, especially the sea waters... are protected from the destruction of their species by Man. Their multiplication is so rapid and their means of evading pursuit or traps are so great that there is no likelihood of his being able to destroy the entire species of any of these animals"

(Jean-Baptiste Lamarck, *Philosophie Zoologique*, 1809)

"Man marks the Earth with ruin/his control stops with the shore"

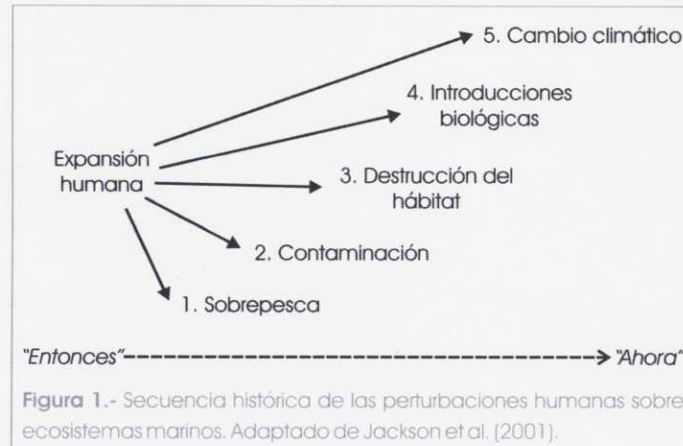
(George Gordon Byron, *Apostrophe to the Ocean*, 1818)

"It is inconceivable that the great sea fisheries, such as those for cod, herring and mackerel, could ever be exhausted"

(Thomas Henry Huxley, *International Fisheries Exhibition*, 1884)

Durante siglos, el hombre creyó que los océanos eran una fuente inagotable de recursos y un sumidero ilimitado de residuos. Sin embargo, este punto de vista ha cambiado en las últimas décadas y en la actualidad no existe ninguna duda acerca de la magnitud creciente del impacto humano sobre ecosistemas costeros y oceánicos (Roberts & Hawkins 1999). En una revisión reciente de datos paleoecológicos, arqueológicos e históricos para distintos ecosistemas marinos (incluyendo bosques de *kelp*, arrecifes de coral, praderas de fanerógamas tropicales y subtropicales, estuarios, y comunidades bénticas de aguas abiertas) Jackson et al. (2001) han concluido que, atendiendo a su importancia, las principales perturbaciones antrópicas que sufren los océanos pueden ordenarse del siguiente modo: sobreexplotación de recursos, contaminación, destrucción del hábitat, introducciones biológicas y, finalmente, cambio climático (Fig. 1).

En la presente memoria, *Nassarius reticulatus* (L.) (Gastropoda, Prosobranchia) es utilizado como organismo modelo con el objetivo de abordar dos grandes líneas de investigación íntimamente relacionadas con las dos principales perturbaciones antrópicas que sufre el medio marino: (i) la conectividad demográfica de poblaciones y (ii) un caso particular de contaminación que ha recibido considerable atención en las últimas décadas (contaminación por tributilo de estaño, TBT). Además, el hallazgo de una especie invasora durante el transcurso de las anteriores investigaciones, *Cyclope neritea* (Gastropoda, Prosobranchia), ha permitido abordar también el estudio de esta clase de amenazas relativamente recientes y sus posibles relaciones con otras perturbaciones (e.g. contaminación, cambio climático).



1. DISPERSIÓN Y FLUJO GENÉTICO EN MEDIO MARINO

1.1. IMPORTANCIA Y APROXIMACIONES TRADICIONALES A SU ESTUDIO

Un aspecto prioritario de la investigación científica en nuestros días es determinar la capacidad de dispersión de las especies y la conectividad demográfica de sus poblaciones. En medio marino tales estudios constituyen particularmente un reto dada la gran extensión de las masas oceánicas (~70% de la superficie del planeta) y las dificultades que éstas plantean para observar los organismos y tomar muestras. Sin embargo, es también en este medio donde la conectividad de las poblaciones adquiere especial relevancia: las especies acuáticas son los únicos organismos que aún se siguen explotando en números considerables para consumo humano a partir de su medio natural (Waples 1998) y la gestión sostenible de tales explotaciones (principalmente peces pero también otros grupos taxonómicos como mamíferos, reptiles, crustáceos, moluscos, equinodermos o algas) necesariamente implica cierto conocimiento acerca de la estructura de sus poblaciones. De este modo, algunas aplicaciones prácticas de estos estudios en el medio marino incluyen definir *stocks* (Gomes et al. 1998, Burton & Tegner 2000, Thorpe et al. 2000, Castillo et al. 2004), diseñar áreas marinas protegidas (Botsford et al. 2003, Palumbi 2003, Sale et al. 2005) o controlar plagas y especies invasoras (Stæhr et al. 2000, Schaffelke et al. 2002, Roman & Palumbi 2004).

Tradicionalmente, el estudio de las distancias de dispersión ha sido abordado mediante marcaje-recaptura de individuos. Las estimas inferidas a partir de esta aproximación son propensas a tres tipos de sesgos (Johnson & Black 1995): (i) el estrés ocasionado a los individuos durante la captura, marcado y liberación puede provocar un incremento de su tasa de dispersión; (ii) la probabilidad de recaptura es mayor en individuos que han recorrido menores distancias de modo que las estimas obtenidas estarán generalmente infravaloradas; y (iii) la importancia de eventos esporádicos sobre la

capacidad de dispersión de las especies fluctuará con la escala temporal del estudio. Además, en el caso particular de los organismos marinos estos trabajos presentan una serie de limitaciones adicionales ocasionadas, no sólo por las características del medio acuático, sino también por las peculiaridades de los ciclos vitales de muchas especies. Así, la existencia de fertilización externa y/o una fase larvaria planctónica caracteriza a muchos de estos organismos pero el marcaje resulta únicamente factible en individuos adultos de tamaño considerable.

Como consecuencia de lo anterior, la aplicación de tales estudios al medio marino ha sido relativamente escasa. Ante tal ausencia de datos, la conectividad de las poblaciones en dicho medio se infirió a partir de ciertas características generales del hábitat y de las propias especies. Así, durante mucho tiempo se asumió que las poblaciones de organismos marinos presentaban menos estructuración que las de organismos terrestres puesto que (Caley et al. 1996): (i) el medio marino es homogéneo y carece de barreras a la dispersión; (ii) las especies marinas presentan tamaños poblacionales relativamente grandes; y (iii) muchas de esas especies también poseen una fase larvaria que asegura la dispersión. Sin embargo, ciertos hechos ocurridos durante la segunda mitad del siglo XX, entre los cuáles destaca el colapso de muchas pesquerías y el descubrimiento de numerosas especies crípticas, han puesto en alerta a la comunidad científica. Tales sucesos parecen indicar que el aislamiento en el medio marino es más frecuente de lo que se había sospechado. De este modo, surge nuevamente la necesidad de estimar la conectividad de las poblaciones en dicho medio y determinar qué factores la condicionan.

1.2. APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES AL ESTUDIO DE LA DISPERSIÓN

A finales de la década de 1960 el advenimiento de las técnicas moleculares proporciona una nueva aproximación al estudio de la conectividad demográfica de poblaciones. En el año 1966, Lewontin & Hubby demuestran que se puede estimar el flujo genético entre poblaciones de *Drosophila pseudoobscura* a partir de las diferencias entre individuos reveladas por la técnica de electroforesis de proteínas (Lewontin & Hubby 1966). Tal aproximación presenta ciertas ventajas sobre los trabajos clási-

cos de marcado-recaptura (Johnson & Black 1995, Lowe et al. 2004): (i) menor dificultad logística y mayor rapidez al no ser necesario monitorizar los individuos a lo largo del tiempo, (ii) costes relativamente bajos que permiten analizar un número mayor de individuos y poblaciones, (iii) proporciona una visión global de los procesos ocurridos durante cientos de generaciones mientras que las estimas obtenidas con estudios de marcado-recaptura son limitadas en espacio y tiempo y, finalmente, (iv) sólo refleja eventos de migración exitosos, *i.e.* los que conducen a un establecimiento de propágulos y/o migrantes en la población receptora. Estos estudios adquieren enorme popularidad en los años posteriores y son aplicados a una amplia variedad de grupos taxonómicos. Por lo general, dichas investigaciones refuerzan dos percepciones clásicas acerca de la conectividad entre poblaciones de organismos marinos: (i) relativa ausencia de barreras a la dispersión en comparación con sistemas terrestres (*e.g.* Ward et al. 1994) y (ii) flujo entre poblaciones elevado debido a la presencia de una fase larvaria (revisado en Bohonak 1999).

Al tiempo que aumentan los estudios basados en electroforesis de proteínas, comienzan a desarrollarse otras técnicas cuyo objetivo es detectar variación en el propio ADN: (i) Maxam & Gilbert (1977) y Sanger *et al.* (1977) describen dos métodos distintos para secuenciar fragmentos de ADN; (ii) Avise *et al.* (1979) muestran la posibilidad de observar variación en la molécula de ADN mitocondrial usando endonucleasas de restricción y establecen así las bases de la técnica RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism* o Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción); y (iii) Jeffreys *et al.* (1985b, 1985a) muestran que la variación genética entre individuos también puede ser cuantificada atendiendo al número de copias de ciertas secuencias repetitivas (mini- y microsatélites). Los estudios de variación genética del ADN presentan una importante ventaja sobre los que utilizan electroforesis de proteínas: los primeros pueden emplear tejidos preservados en etanol, tampones o incluso tejidos secos, mientras que los segundos necesariamente implican tejidos frescos o congelados. Las anteriores técnicas no alcanzan sin embargo gran popularidad hasta la descripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), a finales de la década de 1980 (Mullis et al. 1986, Mullis & Faloona 1987). La técnica de la PCR (básicamente una reacción de extensión de un cebador *in vitro*, cataliza-

da por una ADN polimerasa termoestable, con la finalidad de amplificar un fragmento específico de ADN) supone una auténtica revolución metodológica ya que el fragmento objeto de la amplificación puede ver incrementada su concentración en un factor de 10^6 . Tal incremento hace posible ver los productos obtenidos directamente en un gel (tras tinción con ciertos colorantes, e.g. bromuro de etidio, y exposición a luz ultravioleta) eliminando así la necesidad de usar radionucleótidos y largos tiempos de exposición como se venía haciendo hasta entonces. Una segunda ventaja es la pequeña cantidad de material de partida necesaria, lo que permite aplicar métodos de muestreo no destructivos e incluso hace posible estudiar fósiles o ejemplares de museo. De esta manera, con la incorporación de la técnica de la PCR, los estudios de detección de variación genética del ADN sufren un crecimiento exponencial. Pronto dichos estudios van ganando terreno a los basados en electroforesis de proteínas, cuyo uso exhaustivo había revelado ciertas limitaciones (e.g. bajo polimorfismo en algunos casos, incapacidad para separar electroforéticamente todos los alelos de una muestra o comportamiento no neutral). Además, continúa la descripción de métodos de detección de la variación genética nuevos y más sensibles: *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP; Orita et al. 1989), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD; Welsh & McClelland 1990, Williams et al. 1990) o *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP; Vos et al. 1995) entre otros. Del mismo modo, resulta muy importante el desarrollo paralelo en otros campos del conocimiento como la estadística o la informática, que permite mejoras importantes en el análisis de datos.

El gran número de estudios publicados en el medio marino con técnicas de detección de la variabilidad genética más sensibles muestra que los patrones de dispersión resultan más complejos de lo que previamente se había asumido en base a características generales del medio y del ciclo vital de los organismos. Así, se observa que dicho medio, aparentemente homogéneo, con frecuencia presenta barreras físicas de naturaleza diversa que ocasionan retención de individuos y autoreclutamiento: (i) cuerpos de agua más o menos aislados (Heipel et al. 1998, Huang et al. 2000, Engelen et al. 2001, Perrin et al. 2004), (ii) canales de aguas profundas (Bentzen et al. 1996, Bernardi 2000), (iii) corrientes oceanográficas (Arndt & Smith 1998, Alberto et al. 1999, Goldson et al. 2001, Sotka et al.

2004, Waters & Roy 2004), o (iv) afloramientos (Waters & Roy 2004). Igualmente, se describen barreras ecológicas provocadas por cambios de la temperatura, salinidad o tipo de sustrato (Riginos & Nachman 2001). Incluso se sugiere que ciertas larvas presentan comportamientos migratorios más dinámicos de lo que se pensaba (e.g. natación activa o selección de un sustrato adecuado; Barber et al. 2002).

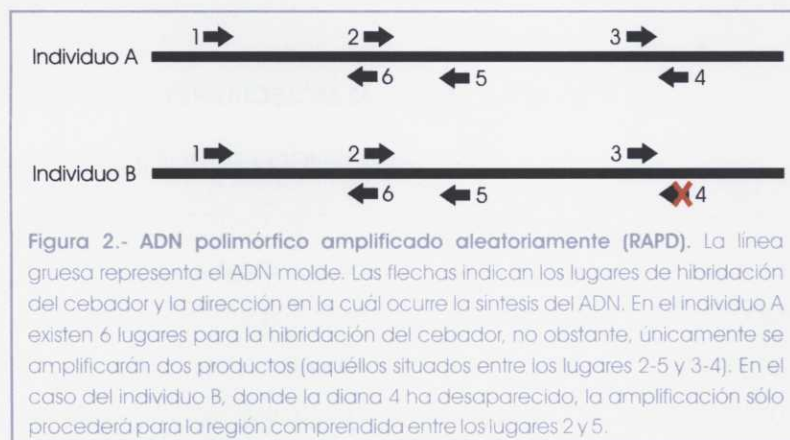
1.3. TÉCNICAS MOLECULARES EMPLEADAS EN ESTA MEMORIA

1.3.1. ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO ALEATORIAMENTE (RAPD)

En 1990 dos publicaciones independientes describen un método que utiliza la técnica de PCR y cebadores de secuencia arbitraria para obtener marcadores moleculares en cualquier tipo de genoma. Welsh & McClelland (1990) denominan dicho método "*Arbitrarily Primed PCR*" (AP-PCR) mientras Williams et al. (1990) se refieren a él como "*Randomly Amplified Polymorphic DNA*" (RAPD). Estos autores convienen que ambos trabajos se han publicado simultáneamente y que deben por tanto citarse juntos; a fin de designar la técnica se acaba imponiendo sin embargo el nombre propuesto por Williams et al. (1990), y más frecuentemente su acrónimo.

Con la técnica RAPD, el ADN genómico del organismo objeto de estudio se amplifica utilizando un único cebador de secuencia corta y arbitraria. En teoría, existen a lo largo del ADN molde numerosas secuencias diana complementarias al cebador; no obstante, la amplificación sólo ocurre en aquellas regiones donde dichas secuencias complementarias están presentes en ambas hebras del ADN en orientaciones opuestas y relativamente próximas (Fig. 2). Como resultado se obtienen un conjunto de fragmentos de distinto tamaño (200 - 2000 pares de bases o bp) que pueden separarse e identificarse mediante electroforesis. Los polimorfismos detectados pueden reflejar cuatro procesos mutacionales: (i) si una delección afecta a una de las secuencias diana la amplificación no tiene lugar, (ii) la ausencia de amplificación también puede estar ocasionada por un cambio nucleotídico en una de las secuencias diana, (iii) de igual modo, una inserción de tamaño considerable entre las secuencias diana ocasiona un incremento en la distancia que las separa y, en consecuencia, la no amplifi-

cación del marcador y, finalmente, (iv) la inserción o delección de un fragmento de pequeña longitud entre las secuencias diana se traduce en una variación del tamaño del marcador. Sin embargo, como el último de esos procesos se ha observado sólo en raras ocasiones (Weising et al. 1994), dichos polimorfismos se expresan mayoritariamente como presencia/ausencia del producto amplificado.



1.3.1.1. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS MARCADORES RAPD

Los cebadores RAPD-PCR no están diseñados para amplificar una secuencia diana específica. En consecuencia, los fragmentos resultantes son anónimos y se encuentran virtualmente distribuidos a lo largo de todo el genoma. Tales características confieren a estos marcadores dos ventajas considerables (Williams et al. 1990, Williams et al. 1993, Grosberg et al. 1996): en primer lugar, no es necesario ningún conocimiento *a priori* de la biología molecular del organismo objeto de estudio; en segundo lugar, una fracción importante de los fragmentos estudiados debe actuar como marcadores neutrales (*i.e.* no sometidos a selección natural). Otros aspectos destacables de la técnica son (Carlson et al. 1991, Hunt & Page 1992):

- Muestrea de modo relativamente inesgado una gran proporción del genoma del individuo.
- El número de segmentos amplificados en un individuo particular utilizando un cebador oscila típicamente entre 0 y 30; sin embargo, puesto que cientos de estos oligonucleótidos están disponibles comercialmente, el número de marcadores que pueden estudiarse es, en potencia,

ilimitado.

- Un mismo cebador puede emplearse teóricamente en cualquier tipo de organismo.
- Se requiere una cantidad mínima de tejido y éste puede almacenarse indefinidamente antes del análisis utilizando métodos de conservación adecuados.
- Es un procedimiento sencillo, rápido, no excesivamente costoso ni laborioso.

El entusiasmo general motivado por las anteriores ventajas pronto se vio, sin embargo, ensombrecido por ciertos problemas técnicos y analíticos (revisado en Grosberg et al. 1996):

- Reproducibilidad de los patrones de bandas. Un problema recurrente de muchas técnicas basadas en la PCR radica en que distintas condiciones de amplificación generan distintos productos. La susceptibilidad de la técnica RAPD hacia tales amplificaciones artefacto es particularmente elevada pues: (i) los fragmentos que genera son anónimos; (ii) las condiciones de hibridación entre el ADN molde y el cebador son muy permisivas; y (iii) numerosas variables de la amplificación pueden afectar al patrón de bandas (e.g. modelo del termociclador; temperaturas de hibridación; tiempos de desnaturalización, hibridación y extensión; rampas de temperatura; concentraciones de cebadores, ADN molde, dNTPs, Mg^{2+} y *Taq* polimerasa).
- Dominancia. Los polimorfismos detectados con la técnica RAPD se expresan mayoritariamente como presencia/ausencia del producto amplificado (Weising et al. 1994) y por tanto muestran herencia dominante: la ausencia de una banda en un *locus* particular indica un individuo homocigoto (genotipo -/-), pero su presencia puede denotar tanto un individuo homocigoto (+/+) como uno heterocigoto (+/-). En consecuencia, los marcadores RAPD proporcionan menos información por *locus* que otros marcadores con herencia codominante (e.g. alozimas), y las frecuencias alélicas pueden estimarse sólo si se asume equilibrio Hardy-Weinberg.
- Variación en la intensidad de las bandas y límites de detección. Las bandas RAPD se puntúan normalmente como caracteres discretos (i.e. presencia/ausencia). Sin embargo, algunas bandas muestran una amplificación más consistente que otras y una determinada banda puede

variar su intensidad en distintos individuos desde prácticamente invisible a muy brillante. Así, un determinado *locus* puede puntuarse como homocigoto nulo cuando en realidad está presente un producto amplificado débilmente.

- Comigración de bandas. Los marcadores RAPD pueden ser numerosos y estar poco espaciados en el gel de agarosa. De este modo, la amplificación de distintos *loci* (o incluso distintos alelos de un mismo *locus*) puede no ser distinguible atendiendo únicamente a su peso molecular.
- Variación no mendeliana. Algunos productos RAPD pueden exhibir reproducibilidad óptima pero carecer de base genética al tener su origen en distintos artefactos (e.g. contaminación o degradación del ADN).

Estas limitaciones ocasionaron en muchos casos un rechazo absoluto de la técnica. Otros autores, sin embargo, opinan que dichos inconvenientes han sido exagerados y pueden solventarse en muchos casos con sólo seguir protocolos adecuados (Grosberg et al. 1996).

1.3.1.2. APLICACIONES DE LA TÉCNICA RAPD

En el ámbito de la ecología molecular, la técnica RAPD se ha aplicado con resultados satisfactorios a distintas cuestiones (revisado en Hadrys et al. 1992), por ejemplo:

- Determinar la identidad taxonómica. La técnica RAPD puede generar marcadores de diagnóstico que permiten reconocer distintas categorías taxonómicas. Así, se ha empleado en diversos estudios para determinar (i) diferencias intraespecíficas en poblaciones de algas (Patwary et al. 1993, Meneses 1996, Faugeron et al. 2001), fanerógamas (Russell et al. 1993, Bauert et al. 1998, Cardoso et al. 1998, Huff & Quinn 1998, Jiménez et al. 2002, Maldonado San Martín et al. 2003), moluscos (Heipel et al. 1998, Holmes et al. 2003), crustáceos (Aubert & Lightner 2000) o vertebrados (Exadactylos et al. 2003), (ii) diferencias interespecíficas en algas (Dutcher & Kapraun 1994, Barreiro et al. 2006), musgos (Zouhair et al. 2000), fanerógamas (Anzizar et al. 1998, Nebauer et al. 2000) o moluscos (Crossland et al. 1993, André et al. 1999, Warnke et al. 2000), y (iii) diferencias entre cepas salvajes y cepas cultivadas (Graham et al. 1997, Belaj et al. 1999, Mailer & May

1999, Gemas et al. 2000).

- Análisis de flujo genético interespecífico y especiación híbrida. Los marcadores RAPD pueden emplearse también para detectar híbridos en poblaciones o especies (Barker et al. 1996, Dawson et al. 1996, Perron & Bousquet 1997).
- Estructura de poblaciones. En la literatura hay numerosos ejemplos de aplicación de marcadores RAPD al estudio de la estructura genética de poblaciones de algas (Bandeira & Nilsson 2001, Engelen et al. 2001), briozoos (Hatton-Ellis et al. 1998, Goldson et al. 2001, Porter et al. 2002), crustáceos (Gouin et al. 2002), fanerógamas (Palacios & González Candelas 1997, Wolff et al. 1997, Jordano & Godoy 2000, Krüger et al. 2002), moluscos (de Wolf et al. 1998, Huang et al. 2000, Star et al. 2003, Holmes et al. 2004) y vertebrados (Haig et al. 1994, Vucetich et al. 2001, Maltagliati et al. 2003) entre otros.
- Determinar el sexo. La técnica RAPD también puede proporcionar marcadores diagnóstico de sexo especialmente útiles en especies sin dimorfismo sexual (Lessells & Mateman 1998, Martínez et al. 1999).
- Determinar resistencias. De igual modo, esta técnica ha sido ampliamente utilizada para identificar marcadores ligados a genes que confieren resistencia frente a infecciones y enfermedades, particularmente en plantas de cultivo (Michelmore et al. 1991, Paran et al. 1991, Banno et al. 1999, Fazio et al. 1999, Haymes et al. 2000).

1.3.2. ADN MITOCONDRIAL

Nuestro conocimiento científico del ADN mitocondrial es mayor que el existente para cualquier región de ADN nuclear de tamaño comparable (Awise 1994). El genoma mitocondrial está constituido por una molécula de ADN de doble cadena típicamente circular; su longitud aproximada oscila entre 15000 y 20000 pares de bases (bp). En su interior se encuentra codificada la información de 37 genes: (i) 22 ARNs transferentes (tRNAs), (ii) 2 ARNs ribosómicos (rRNAs) y, (iii) 13 ARNs mensajeros (mRNAs) específicos de proteínas implicadas en la cadena de transporte electrónico y fosforilación oxidativa.

Además, existe una región no codificante (aproximadamente 1000 bp) conocida como región control o *D-loop* donde se inicia la replicación y transcripción. El orden de las distintas regiones y genes dentro de la molécula parece estable, si bien se han establecido algunas diferencias para ciertos animales superiores.

Cuatro características de la molécula de ADN mitocondrial la convierten en una herramienta ideal para estudios de genética de poblaciones (Avice 1994, Féral 2002):

- Poliplasmia. El número de copias de la molécula de ADN mitocondrial en una célula es elevado (cada mitocondria presenta típicamente entre 2 y 10 copias de su genoma; además, el número de tales orgánulos en el interior de una célula puede exceder el millar). Su estudio resulta así muy adecuado en especímenes degradados pues la probabilidad de encontrar porciones de ADN intactas es mayor para dicha molécula que para el genoma nuclear de copia única.
- Homoplasmia. Este concepto hace referencia a la existencia de un único tipo de ADN mitocondrial en todos los tejidos de un individuo particular. Se ha sugerido que tal homogeneidad podría estar relacionada con cuellos de botella durante la oogénesis donde el número de mitocondrias se vería drásticamente reducido.
- Herencia materna. El ADN mitocondrial se transmite de modo no mendeliano, generalmente por vía materna (el citoplasma celular del cigoto —donde se encuentran las mitocondrias— procede, en la mayoría de los casos, del óvulo). De este modo, la ausencia de recombinación permite su uso para trazar linajes maternos.
- Tasa de mutación elevada. Por lo general, las secuencias de ADN mitocondrial evolucionan rápidamente y muestran así una alta resolución en estudios de genética de poblaciones. Varios motivos parecen explicar estas tasas de mutación elevadas (Wallace 1994): (i) ausencia de proteínas protectoras como las tipo histona existentes en el genoma nuclear, (ii) elevada exposición a radicales libres generados en el metabolismo oxidativo, (iii) sistemas genéticos de reparación menos eficientes que los del ADN nuclear, y (iv) gran susceptibilidad a los efectos de la deriva genética.

1.3.2.1. TÉCNICAS EMPLEADAS EN ESTUDIOS DE ADN MITOCONDRIAL

A nivel intraespecífico, los polimorfismos detectados en el ADN mitocondrial generalmente reflejan sustituciones puntuales (*i.e.* cambios en una única base) si bien se han registrado también fenómenos de inserción y/o deleción en algunos casos (*e.g.* Sotka et al. 2005). De este modo, el estudio de dicha variación para inferir la estructura genética de poblaciones se ha abordado empleando principalmente dos técnicas: RFLPs y secuenciación directa de fragmentos específicos.

La técnica RFLPs se basa en el uso de endonucleasas de restricción: dichas enzimas son capaces de reconocer una secuencia particular de nucleótidos (por lo general 4-6 bp) y romper el ADN en dicho lugar. De este modo, dado que tales secuencias de reconocimiento y corte pueden aparecer o desaparecer a causa de mutaciones, distintos individuos producirán distintos patrones de bandas tras ser digeridos con un conjunto particular de enzimas. En un primer momento, la variación en el ADN mitocondrial se analizó utilizando la anterior aproximación sobre el total de la molécula. Estos estudios pioneros requerían así, como paso preliminar, aislar las mitocondrias y purificar su ADN (un proceso largo y laborioso que implica una centrifugación en un gradiente de cloruro de Cs). Posteriormente, el desarrollo de la PCR y la publicación de cebadores conservados filogenéticamente (ver Palumbi 1996) simplificaron enormemente la técnica, puesto que resultaba posible amplificar un fragmento de ADN mitocondrial específico que luego podía ser sometido directamente a digestión. Tal simplificación permitió una enorme proliferación de este tipo de estudios. Así, en el año 2000 los RFLPs constituían la aproximación más frecuente en los estudios de genética de poblaciones (Silva & Russo 2000).

Sin embargo, un nuevo avance en nuestros días (la secuenciación automática) va camino de poner fin a la dominancia de los RFLPs. Las bases de esta metodología se establecieron ya a finales de la década de 1970 (Maxam & Gilbert 1977, Sanger et al. 1977). Sin embargo, la ausencia de técnicas capaces de generar secuencias de ADN puras y homólogas limitó sus aplicaciones. De nuevo, el desarrollo de la PCR puso fin a tales inconvenientes y, como resultado, los estudios que emplean la secuenciación de fragmentos específicos de ADN mitocondrial (y en menor medida ADN nuclear) han

crecido exponencialmente en el último par de décadas. La principal ventaja de este tipo de estudios es que la variabilidad genética se resuelve con la máxima resolución posible mientras que, por ejemplo, los estudios que emplean RFLPs sólo detectan diferencias en los lugares implicados en el reconocimiento y corte de las enzimas. Además, disponer de secuencias nucleotídicas permite recuperar información de niveles menos detallados (e.g. mapas de restricción, Geller et al. 1997) mientras que el proceso inverso no es factible. No obstante, la adquisición de tal elevada resolución se logra a expensas de un sacrificio en el número de *loci* e individuos estudiados ya que la técnica continúa siendo muy costosa.

1.3.2.2. UNA NUEVA DISCIPLINA CIENTÍFICA: LA FILOGEOGRAFÍA

Los estudios de variación genética intraespecífica a nivel del ADN mitocondrial presentan dos características importantes: (i) habitualmente revelan numerosos haplotipos, ya que la molécula presenta una tasa evolutiva elevada y, (ii) dichos haplotipos pueden ordenarse filogenéticamente dado su particular modo de herencia (maternal y no recombinante). En consecuencia, la aparición de este tipo de estudios constituye no sólo una revolución metodológica sino también ideológica. Por primera vez se incorpora una perspectiva histórica a los estudios de genética poblacional, reconociendo así la profunda influencia que los procesos pasados pueden presentar sobre la distribución actual de las especies y sus linajes. De hecho, el impacto de las anteriores ideas es tan grande que incluso surge una nueva disciplina para acoger aquellos estudios que las contemplan: la filogeografía.

En el pasado reciente de nuestro planeta, los periodos glaciales probablemente son el evento histórico más relevante, de modo que las consecuencias de dichos periodos sobre la estructura genética contemporánea de las especies son un tema recurrente en estudios filogeográficos. Estas investigaciones han mostrado patrones muy coherentes para la flora y fauna terrestres del hemisferio norte en lo relativo a áreas de refugios glaciales, rutas de colonización postglacial y distribución geográfica de linajes (revisado en Hewitt 1999, Hewitt 2000, Hewitt 2004). En el medio marino, donde este tipo de estudios sólo ha comenzado a recibir una atención comparable en los últimos años, dicha concor-

dancia parece reducirse a algunos ejemplos en el Indo-Pacífico y en las costas atlánticas de Norteamérica (Avice 1992, Wares & Cunningham 2001). Sorprendentemente, el pasado filogeográfico de los organismos del Atlántico costero Europeo sigue siendo poco conocido.

2. CONTAMINACIÓN POR TRIBUTO DE ESTAÑO (TBT)

2.1. EL PROBLEMA DE LA BIOINCRUSTACIÓN Y SU PREVENCIÓN

Se conoce con el nombre de bioincrustación (del inglés *biofouling*) al conjunto de organismos que crece sobre estructuras sumergidas de origen antrópico: cascos de las embarcaciones, plataformas petrolíferas o de gas, boyas, emisarios marinos, instrumentos de investigación oceanográfica, equipamiento relacionado con la industria de la acuicultura e, incluso, los propios organismos objeto de cultivo (Omae 2003). Tal asentamiento y proliferación de organismos epibiontes genera distintos problemas. Por ejemplo, en las estructuras estacionarias se aceleran los procesos de corrosión mientras que en las embarcaciones se incrementa la rugosidad del casco ocasionando mayor fricción y gasto de combustible. Todo ello se traduce en importantes pérdidas económicas (Bennett 1996, Evans et al. 1998).

El desarrollo de métodos para combatir la bioincrustación se remonta ya a fenicios y cartagineses, quienes revestían con láminas de cobre los cascos de sus embarcaciones (Champ & Seligman 1996). Dichos recubrimientos siguieron utilizándose hasta el siglo XVIII, momento en el que comienzan a construirse buques de hierro y los recubrimientos dejan de ser efectivos ya que la asociación de cobre metálico con hierro ocasiona que el primero pierda su capacidad biocida. Ya en el siglo XIX se comercializan las primeras pinturas *antifouling* que consisten básicamente en resinas impregnadas con sulfato de cobre. Durante la primera mitad del siglo XX continúa la búsqueda de nuevas formulaciones y son patentadas otras pinturas basadas en plomo o mercurio. Sin embargo, su uso es prohibido en diversos países debido a la persistencia ambiental de estos metales (Champ & Pugh 1987). Así, el cobre continúa siendo el principal biocida de los tratamientos antiincrustantes hasta principios de la década de 1960 cuando irrumpen en el mercado las soluciones basadas en organoestánicos

(principalmente tributilo de estaño –TBT– y, en menor medida, trifenilo de estaño –TPhT–). Las pinturas *antifouling* que contienen dichos compuestos muestran una serie de ventajas sobre los tratamientos tradicionales de cobre: (i) mayor eficacia y duración de su efecto; (ii) no provocan corrosión galvánica cuando se aplican a estructuras de aluminio; (iii) amplia gama de colores (el TBT es un compuesto incoloro); y (iv) bajos costes de fabricación. Estas ventajas hacen que en sólo una década se utilicen de modo generalizado por todo el planeta (de Mora 1996). Reflejo de esta enorme aceptación es la evolución temporal de su producción mundial: tan sólo 2000 toneladas en 1960 pero aproximadamente 16000 diez años después y unas 40000 a mediados de la década de 1980 (Omae 2003).

2. 2. LOS DAÑOS COLATERALES DEL TBT

En un primer momento, los compuestos organoestánicos parecieron muy convenientes desde el punto de vista ambiental ya que eran degradados fácilmente por la luz ultravioleta y los microorganismos (Omae 2003). Sin embargo, pronto se comenzó a sospechar que su liberación al medio acuático podía presentar un impacto negativo sobre organismos no diana. Así, a finales de la década de 1960 se advierte del peligro que conlleva el empleo de estas pinturas en áreas próximas a instalaciones de acuicultura canadienses (Thomas 1969). No obstante, su uso continuó incrementándose durante la década de 1970.

La primera evidencia clara de los efectos perjudiciales del TBT sobre organismos no diana se establece a principios de la década de 1980 en la bahía francesa de Arcachon, un área ostrícola de importancia mundial con una producción anual estimada en 10000-15000 toneladas. A finales de la década de 1960 tienen lugar en esta área los primeros registros de individuos de *Crassostrea gigas* que exhiben un engrosamiento anormal de la concha, una anomalía que afecta de modo considerable a la calidad del producto final destinado al consumo humano (Fig. 3). Dicha deformación se generaliza a partir de 1974, afectando no sólo a todos los parques de cultivo sino también a un porcentaje muy elevado de sus individuos. A la situación anterior se une una caída drástica de las puestas. Como consecuencia, la industria ostrícola de la zona sufre a principios de la década de 1980 un

importante colapso con pérdidas que superan los 150 millones de dólares. Dichos acontecimientos son relacionados por Alzieu et al. (1982) con el lixiviado de TBT de las pinturas antiincrustantes. Esta relación se verá confirmada en años posteriores con la publicación de otros trabajos en diversas áreas geográficas: Inglaterra (Waldock & Thain 1983), Estados Unidos (Stephenson et al. 1986), Japón (Okoshi et al. 1987) o Australia (Batley et al. 1989).

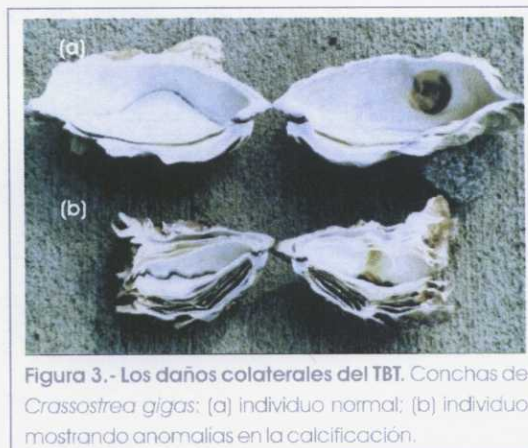


Figura 3. - Los daños colaterales del TBT. Conchas de *Crassostrea gigas*: (a) individuo normal; (b) individuo mostrando anomalías en la calcificación.

Es también a principios de la década de 1980 cuando se vincula la contaminación por TBT con otro fenómeno observado durante la década anterior en distintos puntos del planeta: la superimposición de caracteres sexuales masculinos sobre las hembras de algunos gasterópodos dioicos (*i.e.* imposex, Smith 1971). De nuevo, las observaciones obtenidas relacionan de modo concluyente ese imposex con el TBT procedente de las pinturas antiincrustantes (Smith 1981c, 1981a, 1981b) y, al igual que en el caso de la ostra, a estos trabajos pioneros les suceden en poco tiempo otros en distintas regiones del mundo (Gibbs & Bryan 1996).

2. 3. EL IMPOSEX EN GASTERÓPODOS MARINOS

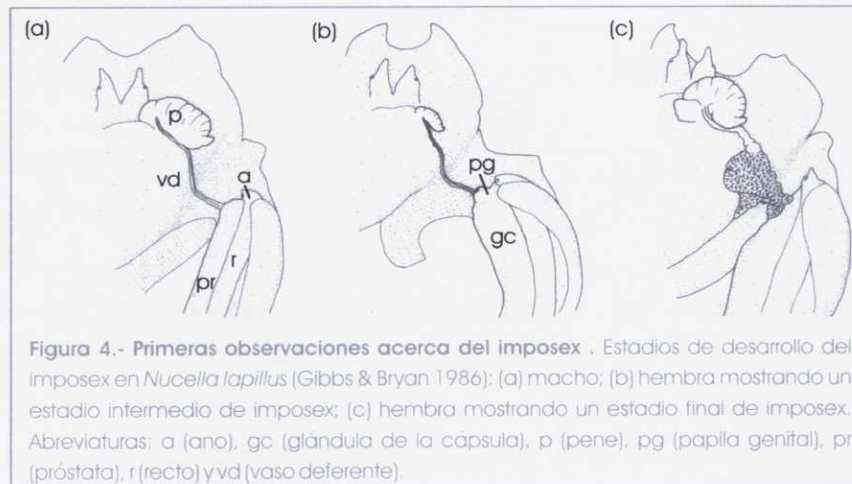
2.3.1. PRIMERAS OBSERVACIONES ACERCA DEL IMPOSEX

La mayoría de los gasterópodos marinos muestran sexos separados y permanentes a lo largo de la vida del individuo (i.e. especies dioicas). Hasta finales de la década de 1960, la distinción de machos y hembras en este grupo requería un simple examen macroscópico con la finalidad de detectar la presencia o ausencia de pene. Esta situación cambió radicalmente en torno a 1970: una estructura similar a un pene en morfología y posición se registra de modo independiente y casi simultáneo en hembras de 4 especies dioicas de regiones geográficamente distantes entre sí: *Nucella lapillus* en Inglaterra (Blaber 1970), *Ocenebra erinacea* en Francia (Poli et al. 1971), *Ilyanassa obsoleta* en la costa atlántica de Norteamérica (Smith 1971) y *Thais emarginata* en la costa pacífica de Norteamérica (Houston 1971). De hecho, las observaciones en *I. obsoleta* no se limitan únicamente a la presencia de un pene y se establece que las hembras afectadas también muestran otros dos rasgos característicos del sexo opuesto: (i) un conducto que sigue la misma trayectoria que el vaso deferente masculino y (ii) un oviducto convolucionado que refleja la morfología típica de la vesícula seminal; un fenómeno que es denominado en su conjunto con el término imposex por B.S. Smith, autor de estas observaciones (Smith 1971). Investigaciones posteriores sobre esta especie muestran que la frecuencia de individuos afectados se incrementa con la proximidad a áreas de tráfico marítimo intenso (Smith 1981b) y, poco tiempo después, experiencias de exposición en el laboratorio vinculan de modo inequívoco dicha masculinización con el TBT procedente de las pinturas antiincrustantes (Smith 1981a, 1981c). Sin embargo, este fenómeno no recibe mayor atención una vez establecido el agente causal, puesto que el desarrollo de pene y conducto deferente en las hembras de este gasterópodo no parece perturbar de modo alguno el normal funcionamiento de los individuos afectados.

Cinco años después de que la masculinización de hembras de *Ilyanassa obsoleta* se relacionase con el lixiviado de TBT, la investigación se retoma en Inglaterra, donde se observa que el imposex reduce severamente la capacidad reproductiva de las poblaciones de *Nucella lapillus* (Bryan et al. 1986). Las Investigaciones preliminares muestran que el imposex exhibe tres grados de desarrollo dosis-

dependientes en esta especie (Fig. 4; Gibbs & Bryan 1986):

- Estadio temprano: surgen las secciones proximal (*i.e.* en las inmediaciones de la papila genital) y distal (*i.e.* bajo el tentáculo ocular derecho, en el área donde los machos desarrollan el pene) del conducto deferente que se extienden progresivamente hasta fusionarse en un punto intermedio; además, aparece un pequeño pene.
- Estadio intermedio: el pene incrementa su longitud alcanzando en muchos casos el tamaño habitual en los machos de la especie, *i.e.* 2.5 - 4 mm.
- Estadio final: el conducto deferente continúa su crecimiento llegando a bloquear la apertura del oviducto (*i.e.* papila genital femenina).



Los estadios temprano e intermedio no presentan consecuencias para la reproducción del individuo. Sin embargo, el bloqueo de la papila genital femenina en el estadio final impide la deposición de cápsulas y las hembras afectadas sufren así una esterilidad funcional. Además, puesto que la formación de más cápsulas continúa, éstas siguen acumulándose dentro del individuo pudiendo provocar su muerte. El estudio de poblaciones naturales y diversas experiencias de exposición (en el campo o en el laboratorio) permiten establecer también en *Nucella lapillus* una inequívoca relación entre imposex y contaminación con TBT. Se observa además que tal masculinización no sólo tiene lugar de un

modo dosis-dependiente, sino que también se inicia a concentraciones ambientales de TBT extremadamente bajas (<0.5 ng TBT-Sn l^{-1}), por debajo de los límites de detección analítica de la época (Bryan et al. 1986, Gibbs & Bryan 1986, Bryan et al. 1987).

A finales de la década de 1980, el imposex comienza a estudiarse en otros gasterópodos. Los resultados de esos estudios son abrumadores reflejando la ubicuidad de la contaminación por TBT. Así, en 1991 el fenómeno se ha visto ya en 69 especies (Fioroni et al. 1991). Estas investigaciones revelan que su desarrollo sigue una pauta muy similar en todas ellas, si bien se detectan diferencias en sensibilidad (i.e. concentración umbral que desencadena la respuesta) y consecuencias finales (i.e. esterilidad funcional). Uno de los gasterópodos más susceptibles al efecto masculinizante del TBT es *Nucella lapillus*. En este animal la imposición de pene y vaso deferente tiene lugar para concentraciones de TBT en agua de tan sólo 1-2 ng TBT-Sn l^{-1} , niveles de aproximadamente 5 ng TBT-Sn l^{-1} ocasionan esterilidad y a concentraciones que superan los 25 ng TBT-Sn l^{-1} se inicia la espermatogénesis (Gibbs et al. 1988). En el extremo opuesto destacan especies como el buccínido neozelandés *Cominella glandiformis*. Este gasterópodo no parece desarrollar imposex incluso tras ser expuesto durante 150 días a concentraciones de TBT tan elevadas como 500-600 ng TBT-Sn l^{-1} (Smith & McVeagh 1991). De hecho, el imposex muestra consecuencias negativas para la reproducción principalmente en miembros de la familia Muricidae: e.g. *N. lapillus* (Gibbs & Bryan 1986), *Nucella lamellosa* (Bright & Ellis 1990), *Nucella lima* (Short et al. 1989), *Purpura haustorium* (como *Haustrum haustorium*, Stewart et al. 1992), *Hexaplex trunculus* (Axiak et al. 1995), *Thais orbita* (Stewart et al. 1992), *Thais clavigera* (Horiguchi et al. 1995) o *Urosalpinx cinerea* (Gibbs et al. 1991b). Se sugiere que este comportamiento diferencial es debido a que tracto genital masculino y femenino en murícidos muestran la misma distribución espacial dentro de la cavidad del manto (a diferencia de lo que ocurre en otras familias de neogasterópodos), de modo que la imposición del primero interrumpe el normal funcionamiento del segundo (Fig. 5, Gibbs & Bryan 1996). El proceso subyacente que impide la reproducción de las hembras afectadas es determinado tan sólo en una pequeña fracción de estas especies, pudiendo distinguirse dos mecanismos principales (Fig. 5):

- El crecimiento del vaso deferente en hembras puede llegar a ocluir la papila genital e impedir la deposición de cápsulas. Esto ocurriría en aquellas especies donde próstata y glándula de la cápsula ocupan idéntica posición dentro de la cavidad del manto (e.g. *Nucella* spp.). Este proceso puede implicar incluso una reorganización más profunda del oviducto anterior femenino. Por ejemplo, bajo condiciones de contaminación severa el tejido de la *bursa copulatrix* puede ser reemplazado por tejido prostático.
- Estadios avanzados de imposex en hembras de otras especies (e.g. *O. erinacea* y *U. cinerea*) implican una glándula de la cápsula y una *bursa copulatrix* rasgadas longitudinalmente, lo que impide la cópula y formación de cápsulas. De nuevo, este proceso es un reflejo del correspondiente tracto genital masculino. Los machos de estas especies conservan un rasgo primitivo de los neogasterópodos por el cual la sección posterior de la próstata muestra una apertura longitudinal que conecta su lumen con la cavidad del manto.



2.3.2. EL IMPOSEX Y LA BIOMONITORIZACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR TBT

El imposex en neogasterópodos muestra una serie de características que lo convierten en un excelente biomarcador de exposición a la contaminación por TBT:

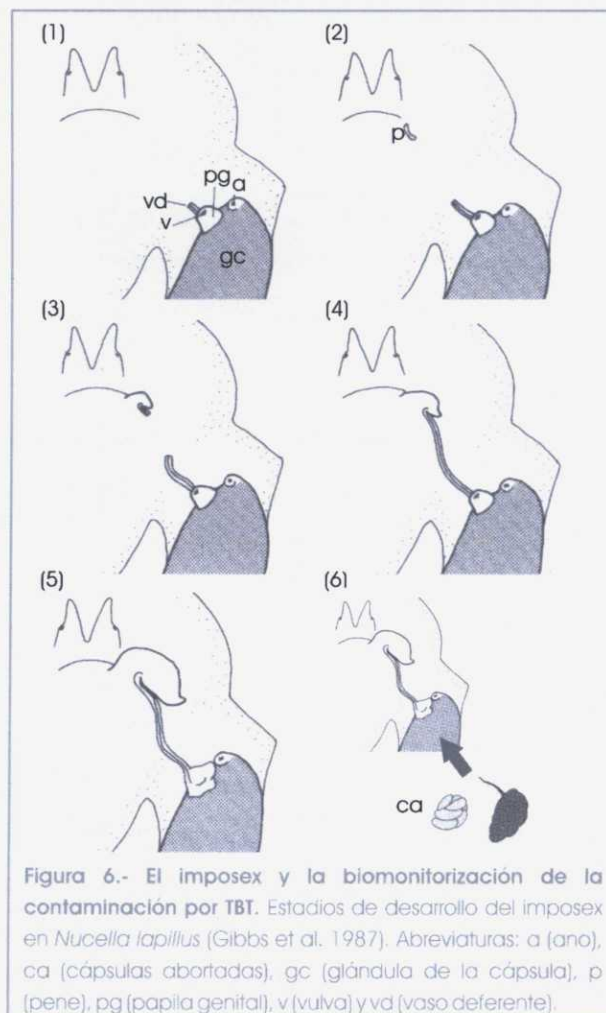
- Es una respuesta altamente sensible. Su inicio ocurre a concentraciones de contaminante extremadamente bajas.
- Su desarrollo ocurre de un modo dosis-dependiente. Resulta así posible no sólo determinar su presencia sino también cuantificar su intensidad.
- Es una respuesta específica. Ningún otro agente ambiental ha demostrado producir esta anomalía (al menos a concentraciones ambientalmente relevantes).
- A diferencia de los análisis químicos que determinan concentraciones del contaminante en diversas matrices ambientales, la evaluación del imposex no requiere de material costoso. Además, dicha respuesta constituye una medida de gran significado biológico que revela de un modo directo los efectos del contaminante sobre un ecosistema dado a nivel individual, poblacional e incluso comunitario.
- Finalmente, medir las concentraciones del contaminante puede estar afectado por procesos puntuales mientras que esta respuesta integra los aportes que sufre un área dada a una escala espacial y temporal mayor.

Así, las investigaciones sobre el binomio imposex-TBT no se han detenido tras las primeras publicaciones que tenían por objetivo registrar la incidencia y características de la respuesta en las distintas especies. Desde finales de la década de 1980 hasta la actualidad el imposex en diversos gasterópodos ha sido extensamente utilizado para inferir los niveles ambientales del contaminante y su evolución temporal en distintas áreas geográficas. De hecho, el imposex constituye el primer efecto biológico específico obligatorio en los estudios de vigilancia requeridos por OSPAR (*Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic*; www.ospar.org) mientras que en los estudios de monitorización relativos a otros contaminantes basta con determinar sus concentraciones en ciertos organismos (generalmente *Mytilus* spp.) y sedimentos.

Los índices de imposex empleados con mayor frecuencia en estudios de biomonitorización son los que cuantifican el grado de desarrollo de pene y conducto deferente:

- Índice del tamaño relativo del pene (*Relative Penis Size Index* o RPSI). Este índice representa el volumen medio del pene de las hembras de una población expresado como porcentaje del de los machos de la misma población ($100 \times [\text{longitud media del pene de las hembras}]^3 / [\text{longitud media del pene de los machos}]^3$). Su formulación se fundamenta en el hecho de que el desarrollo del pene en hembras tiene lugar de un modo dosis-dependiente pero su tamaño no puede compararse sin más al depender del tamaño corporal que, a su vez, varía enormemente entre poblaciones (e.g. los individuos de sitios expuestos al oleaje suelen ser más pequeños que los de sitios protegidos). El RPSI se propuso originalmente en el murícido *Nucella lapillus*, una especie cuyo pene presenta una morfología columelar, y por ello cuantifica su desarrollo atendiendo a su volumen (Gibbs et al. 1987). Su posterior aplicación a otras especies ha requerido pequeñas modificaciones. Así, en aquéllas donde el crecimiento del pene tiene lugar preferentemente en un eje se ha optado por medir simplemente su longitud y calcular el denominado índice de la longitud relativa del pene (*Relative Penis Length Index* o RPLI): e.g. *Nassarius reticulatus* (Stroben et al. 1992b, Bryan et al. 1993, Barreiro et al. 2001, Barroso et al. 2002), *Ilyanassa obsoleta* (Bryan et al. 1989, Curtis & Kinley 1998) o *Lepsiella scobina* (Stewart et al. 1992). En otras especies se ha sugerido incluso que el índice más adecuado es aquél que tiene en cuenta el área o superficie de este órgano: e.g. *Thais* spp. (Wilson et al. 1993).
- Índice de la Secuencia del Vaso Deferente (*Vas Deferens Sequence Index* o VDSI). Este índice calcula el valor medio de los varios estadios de desarrollo de imposex que exhiben las hembras de una población. De nuevo, este índice se propuso originalmente para el murícido *Nucella lapillus* donde Gibbs et al. (1987) describieron un esquema general de evolución del imposex con seis estadios de desarrollo (Fig. 6): hembra normal no afectada (estadio 0), desarrollo de la sección proximal del vaso deferente (estadio 1), desarrollo inicial del pene (estadio 2), desarrollo de la sección distal del vaso deferente e incremento de la longitud del pene (estadio 3), fusión de las secciones distal y proximal del vaso deferente y tamaño del pene comparable al de un macho (estadio 4), proliferación del tejido del vaso deferente en las proximidades de la papila

genital ocasionando un desplazamiento y/o bloqueo del gonoporo femenino (estadio 5) y, finalmente, acúmulo de cápsulas abortadas en el interior de la glándula de la cápsula como consecuencia del anterior bloqueo (estadio 6). Posteriormente, el principio general del esquema de evolución del imposex y del índice VDSI se ha aplicado a otras especies tras las oportunas modificaciones: e.g. *Nucella lima* (Short et al. 1989), *Thais haemastoma* (Spence et al. 1990), *Lepsiella scobina* (Stewart et al. 1992) o *Nassarius reticulatus* (Stroben et al. 1992b, Barreiro et al. 2001).



Además de los dos índices anteriores, en determinadas especies bioindicadoras es posible calcular también otros índices basados en ciertas peculiaridades de la respuesta en el organismo en cuestión:

- Porcentaje de hembras estériles. Pese a que existe una relación evidente entre VDSI y restricción de la fertilidad, puede resultar útil calcular el porcentaje de hembras estériles y tener así una idea directa de la potencial capacidad reproductiva de una población. Obviamente, el cálculo de este índice está limitado a aquellas especies donde el imposex interrumpe el normal funcionamiento del tracto genital femenino.
- Índice del grado de convolución del oviducto. Este índice refleja la masculinización que sufre la porción gonadal del oviducto de ciertos nasáridos (e.g. *Ilyanassa obsoleta*: Smith 1980, *Nassarius reticulatus*: Barreiro et al. 2001, Barroso et al. 2002, o *Cyclope neritea*: Quintela et al. 2006): oviductos rectos (condición normal en hembras no afectadas) reciben el valor de 0, oviductos suavemente convolucionados son puntuados como 1, y a aquéllos fuertemente convolucionados (imitando la vesícula seminal masculina) se les asigna el valor de 2.

2.3.3. EXTENSIÓN GEOGRÁFICA Y TAXONÓMICA DEL IMPOSEX

La extensa información recabada durante los últimos 20 años muestra que el imposex es un fenómeno global y ampliamente extendido que afecta a decenas de gasterópodos (las revisiones más recientes elevan a cerca de 200 el número de especies que exhiben esta anomalía, Shi et al. 2005). Los efectos sobre las poblaciones no sólo se registran en zonas portuarias y estuáricas, sino también en áreas de costa abierta cercanas a rutas de tráfico marítimo (ten Hallers-Tjabbes et al. 1994, Chiavarini et al. 2003, Gomez-Ariza et al. 2006). A causa de su extrema sensibilidad, *Nucella lapillus* exhibe poblaciones afectadas en todo su rango de distribución europeo: e.g. Noruega (Folviksrk et al. 1999), Islandia (Svavarsson & Skarphéðinsdóttir 1995, Svavarsson 2000), Países Bajos (Ritsema et al. 1991), Irlanda (Minchin et al. 1996, Minchin & Minchin 1997), Inglaterra (Gibbs et al. 1987, Gibbs et al. 1991a, Douglas 1993), Francia (Huet et al. 1996, Huet et al. 2004), España (Ruiz et al. 1998, Barreiro et al. 1999) o Portugal (Santos et al. 2000, Santos et al. 2002a, Galante-Oliveira et al. 2006). En esta espe-

cie se ha llegado al extremo de que el imposex es la norma y resulta realmente complicado encontrar poblaciones no afectadas. De hecho, incluso en especies menos sensibles como *Nassarius reticulatus*, las poblaciones no afectadas constituyen una excepción a lo largo de las costas europeas (Stroben et al. 1992b, Bryan et al. 1993, Huet et al. 1995, Gibbs et al. 1997, Barreiro et al. 2001, Pessoa et al. 2001, Barroso et al. 2002, Magnusson & Granmo 2004, Santos et al. 2004, Barroso et al. 2005, Ruiz et al. 2005, Sousa et al. 2005, Rato et al. 2006, Wirzinger et al. 2007).

Fuera del continente europeo se han registrado poblaciones de distintos gasterópodos que exhiben imposex en Canadá (Tester & Ellis 1995, Prouse & Ellis 1997, Horiguchi et al. 2004, Viglino et al. 2006), Alaska (Short et al. 1989), Estados Unidos (Bryan et al. 1989, Curtis & Kinley 1998, Evans et al. 2001, Mann et al. 2006), Chile (Gooding et al. 1999), Argentina (Penchaszadeh et al. 2001), Brasil (Fernandez et al. 2004), Japón (Horiguchi et al. 1997, Horiguchi et al. 1998, Horiguchi et al. 2000), Corea (Shim et al. 2000, Cho et al. 2006), Taiwan (Liu et al. 1997, Hung et al. 2001), Tailandia (Swennen et al. 1997, Bech 1999, 2002a, 2002b), Singapur (Tan 1997, 1999), Indonesia (Evans et al. 1995), India (Vishwa Kiran & Anil 1999), Sudáfrica (Marshall & Rajkumar 2003), Australia (Kohn & Almasi 1993, Nias et al. 1993, Wilson et al. 1993, Reitsema & Spickett 1999, Rees et al. 2001, Gibson & Wilson 2002) o Nueva Zelanda (Stewart et al. 1992) entre otros.

2.3.4. DISRUPCIÓN ENDOCRINA Y EL MECANISMO DEL IMPOSEX

El imposex representa un caso paradigmático de la acción de un contaminante (el TBT) sobre la homeostasis y funcionamiento del sistema endocrino de un organismo (los gasterópodos). Los contaminantes que interfieren con el sistema hormonal constituyen un problema ambiental destacado y creciente puesto que a partir de la Segunda Guerra Mundial se ha liberado al medio ambiente un gran número y cantidad de tales sustancias (Matthiessen 2003). En este contexto, el binomio imposex-TBT ha dejado de ser un fenómeno aislado para integrarse en una línea de investigación, la disrupción endocrina, que persigue caracterizar los compuestos químicos que alteran el sistema endocrino de los organismos y descubrir su modo de funcionamiento.

Pese a que el imposex en gasterópodos prosobranquios se considera uno de los ejemplos mejor documentados de disrupción endocrina en invertebrados acuáticos (Matthiessen & Gibbs 1998), el mecanismo que desencadena dicha respuesta no ha sido establecido aún con certeza. Algunas de las teorías propuestas se resumen brevemente a continuación (revisado en Oehlmann et al. 2007):

- Hipótesis de la inhibición de la aromatasa (Spooner et al. 1991, Stroben et al. 1991): el TBT inhibiría la actividad de la aromatasa dependiente del citocromo *P*-450 provocando un incremento de los niveles endógenos de testosterona.
- Hipótesis de la excreción de testosterona (Ronis & Mason 1996): el TBT bloquearía la conjugación de la testosterona con radicales sulfato disminuyendo considerablemente la eliminación metabólica de este esteroide.
- Hipótesis de los efectos del TBT sobre los niveles de testosterona libre vs. testosterona esterificada (Gooding & LeBlanc 2002): el TBT interrumpiría la ruta metabólica de esterificación de la testosterona incrementando los niveles endógenos de testosterona activa.
- Hipótesis de los efectos sobre el sistema de hormonas peptídicas (Oberdörster & McClellan-Green 2000): el TBT actuaría como una neurotoxina ocasionando una liberación anormal de hormonas peptídicas relacionadas con el desarrollo sexual.
- Hipótesis de los efectos sobre el Receptor Retinoideo X (Nishikawa et al. 2004, Nishikawa 2006): el TBT se uniría a receptores de la superfamilia de las hormonas esteroideas induciendo la transcripción de genes relacionados con el desarrollo de los órganos sexuales.

La hipótesis de la inhibición de la aromatasa ha recibido numerosos apoyos experimentales desde su propuesta a principios de la década de 1990 (Schulte-Oehlmann et al. 1995, Bettin et al. 1996, Santos et al. 2002b, Barroso et al. 2005, Santos et al. 2005) y, de este modo, algunos autores la consideran actualmente la hipótesis mejor fundada (Matthiessen & Gibbs 1998, Oehlmann et al. 2007). La relevancia biológica de la hipótesis de la excreción de testosterona ha sido cuestionada debido principalmente a las elevadas concentraciones de TBT necesarias a fin de desencadenar dicho mecanismo fisiológico (Oehlmann et al. 2007). La validez de la hipótesis de los efectos del TBT sobre los niveles de

testosterona libre vs. testosterona esterificada también ha sido discutida puesto que sus conclusiones no han podido corroborarse utilizando otro potente andrógeno, el fungicida agrícola pirimidínico fenarimol, en el gasterópodo dulceacuícola *Marisa cornuarietis* (Janer et al. 2006). Por otra parte, la teoría de los efectos del TBT sobre el sistema de hormonas peptídicas ha recibido, al igual que la teoría de la inhibición de la aromatasa, considerable apoyo experimental (Oberdörster & McClellan-Green 2004, Oberdorster et al. 2005). Esta hipótesis no contradice necesariamente la anterior y es posible que simplemente contemplen distintos aspectos del sistema endocrino de los prosobranchios (Oberdörster & McClellan-Green 2002). Finalmente, todavía son escasos los estudios sobre la hipótesis más reciente (efectos en el receptor retinoideo X). En todo caso, existen ya resultados contradictorios. Así, mientras que el desarrollo del imposex en *Thais clavigera* y *Nucella lapillus* fue claramente inducido por el ligando natural del receptor retinoideo X en humanos (Nishikawa et al. 2004, Castro et al. 2007), otros autores no han podido confirmar estos resultados (ver Di Benedetto 2005 en Oehlmann et al. 2007).

2.4. DEGRADACIÓN DEL TBT EN EL MEDIO MARINO

La molécula de TBT está constituida por tres cadenas n-butil unidas a un átomo de estaño mediante enlace covalente C-Sn. Esta molécula se degrada perdiendo progresivamente los grupos orgánicos (*i.e.* debutilación secuencial): tributilo de estaño (TBT) → dibutilo de estaño (DBT) → monobutilo de estaño (MBT) → estaño inorgánico (Sn IV). La ruptura de los enlaces C-Sn puede ocurrir por procesos biológicos, químicos o físicos. Sin embargo, sólo los procesos biológicos y químicos muestran relevancia ambiental (Adelman et al. 1990, Batley 1996, Fent 1996): (i) la ruptura térmica es improbable pues el enlace es estable a temperaturas próximas a los 200 °C; (ii) los valores naturales de radiación gamma están muy por debajo de los niveles necesarios para que tenga lugar la anterior disociación; y (iii) la fotodegradación por luz ultravioleta es despreciable debido a su escasa capacidad de penetración en la columna de agua.

Al igual que otros contaminantes de naturaleza hidrofóbica, el TBT se adsorbe rápidamente a material particulado en suspensión (arcillas o materia orgánica). De esta manera, se concentra inicial-

mente en la microcapa superficial de agua (e.g. Cleary & Stebbing 1987). Sin embargo, si su eliminación no ocurre en un periodo de tiempo relativamente corto acaba acumulándose en los sedimentos (e.g. Sarradin et al. 1995). Sus tasas de degradación y vida media difieren de modo significativo en ambos compartimentos:

- En la columna de agua el TBT es poco persistente. Su vida media en condiciones de temperatura estival oscila entre los 7 y los 30 días, si bien para temperaturas invernales puede abarcar algo más de unos dos meses (Fent 1996). Además, para una misma temperatura es posible observar variaciones considerables de dicho periodo atendiendo al mayor o menor contenido en nutrientes. A 28 °C la vida media del TBT en aguas estuáricas es de tan sólo 6-7 días mientras que en mar abierto puede superar las dos semanas (Batley 1996).
- En la superficie óxica de los sedimentos la degradación microbiana difiere relativamente poco de la que ocurre en la columna de agua. Sin embargo, en los sedimentos anóxicos más profundos ésta es significativamente más lenta y el TBT puede permanecer allí almacenado durante décadas (Bosselmann 1996, Seligman et al. 1996). De este modo, los sedimentos pueden actuar como una fuente secundaria de contaminación (*i.e.* sistema *sink-source*) pues el TBT puede ser reciclado a la columna de agua como consecuencia de la actividad de la fauna excavadora u operaciones de dragado (e.g. Santos et al. 2004).

2.5. LEGISLACIÓN RELATIVA AL USO DEL TBT

La profunda crisis socioeconómica que experimenta el sector ostrícola francés entre los años 1977 y 1983 es el detonante del establecimiento de medidas de regulación relativas al uso de TBT en pinturas antiincrustantes (Alzieu 2000). Con el objetivo de disminuir los niveles del contaminante en áreas costeras, Francia prohíbe en enero de 1982 el uso de estas pinturas en embarcaciones con eslora inferior a 25 metros. A finales de la década de 1980 es ya evidente que los acontecimientos registrados en la bahía francesa de Arcachon no constituyen un hecho aislado. Los efectos nocivos del TBT sobre organismos no diana, principalmente bivalvos y gasterópodos, se registran en las costas de todo el planeta. En consecuencia, diversos países siguen el ejemplo francés e introducen semejantes me-

didadas parciales de regulación: e.g. Reino Unido (1987), Estados Unidos (1988), Canadá (1989), Nueva Zelanda (1989), Australia (1989), Noruega (1989) o la Unión Europea (1989) (revisado en Champ 2000). Finalmente, el 16 de noviembre de 1990, el Comité de Protección del Ambiente Marino (*Marine Environment Protection Committee* o MEPC) de la Organización Marítima Internacional (*International Maritime Organization* o IMO) adopta la Resolución MEPC 46(30) "*Medidas para controlar impactos adversos asociados con el uso de tributilo de estaño en pinturas antiincrustantes*" que recomienda a los países miembros: (i) eliminar el uso de TBT en pinturas antiincrustantes en buques de eslora inferior a 25 metros, y (ii) alentar el desarrollo de métodos *antifouling* alternativos. En dicha resolución también se sugiere una tasa de lixiviado de las pinturas inferior a 4 µg TBT/cm² y día para embarcaciones mayores. Sin embargo, no se introducen mayores restricciones asumiendo que las concentraciones del contaminante en mar abierto son irrelevantes.

Estudios de diversa índole a lo largo las costas europeas han registrado una tendencia decreciente en los niveles del contaminante tras la introducción de las anteriores medidas legislativas: (i) recuperación de poblaciones de *Crassostrea gigas* (Alzieu 1991, Dyrinda 1992), (ii) declive de las concentraciones del contaminante en agua y sedimentos (Dowson et al. 1994, Waite et al. 1996, Michel & Averty 1999) o (iii) menor incidencia e intensidad del imposex en poblaciones de gasterópodos (Bryan et al. 1993, Matthiessen et al. 1995, Evans et al. 1996, Harding et al. 1997, Svavarsson 2000, Birchenough et al. 2002). Un descenso similar ha sido descrito asimismo para las costas de Estados Unidos (Valkirs et al. 1991, Huggett et al. 1996), Canadá (Reitsemá et al. 2002), Nueva Zelanda (Smith 1996) o Australia (Rees et al. 2001) entre otros.

Pese a lo anteriormente expuesto, las concentraciones ambientales de TBT continúan siendo preocupantes para numerosos organismos. Así, distintos países han proclamado la necesidad de que este compuesto sea totalmente prohibido. Recientemente, la Organización Marítima Internacional (IMO) ha adoptado el "*Convenio Internacional sobre el Control de Sistemas Antiincrustantes Nocivos en Buques*". Este acuerdo prohíbe re aplicar pinturas con TBT en embarcaciones de todo tipo a partir del 1 de enero de 2003, con el objetivo de que en enero de 2008 no quede ni un solo barco pintado

con este compuesto (Champ 2000). Sin embargo, su ratificación por el número requerido de países (*i.e.* veinticinco estados cuyas flotas mercantes combinadas representen no menos del 25% del tonelaje bruto de la marina mercante mundial) ha ocurrido tan sólo recientemente, el 17 de septiembre de 2007. En consecuencia, dicha prohibición entrará en vigor a partir del 17 de septiembre de 2008. Las principales voces en contra de esta prohibición total han destacado las múltiples ventajas económicas y “ambientales” asociadas al uso de este compuesto al tiempo que han esgrimido la ausencia de alternativas relevantes (Abbott et al. 2000, Abel 2000, Evans et al. 2000).

3. *NASSARIUS RETICULATUS*: UN ORGANISMO MODELO EN EL ATLÁNTICO NORDESTE

3.1. BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE *NASSARIUS RETICULATUS*

Nassarius reticulatus (L.) es un gasterópodo marino del grupo de los prosobranquios neogasterópodos (Tabla 1). Se trata de una especie que muestra una amplia distribución a lo largo del litoral atlántico europeo: desde los archipiélagos de Canarias y Azores hasta el norte de Noruega; además, también ha sido registrada en las costas de los mares Mediterráneo y Negro (Fretter & Graham 1985). Habita fondos arenosos o arcillosos del intermareal e infralitoral hasta una profundidad de aproximadamente 35 m. Puede de esta manera encontrarse con facilidad en enclaves protegidos donde predomina la sedimentación, pero también en costas rocosas con sustrato blando. Sus poblaciones proliferan igualmente en ambientes salobres puesto que tolera amplias variaciones de salinidad (Eriksson & Tallmark 1974).

Phylum: Mollusca
Clase: Gastropoda
Subclase: Prosobranchia
Orden: Neogastropoda
Familia: Nassariidae Iredale, 1916
Género: *Nassarius* Duméril, 1806
Especie: *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758)
Sinónimos: *Hinia reticulata* (Linnaeus, 1758)

Tabla 1.- Biología y ecología de *Nassarius reticulatus*. Clasificación taxonómica de la especie.

La concha , típicamente parda, puede alcanzar 30 mm de longitud; es cónica y posee una ornamentación profusa: numerosas costillas axiales y estrías en espiral se entrecruzan en su superficie dando lugar a un patrón reticulado característico (Fig. 7), rasgos a los que alude el nombre de la es-

pecie ("*nassa*" = con forma de red y "*reticulata*" = reticulada). La apertura es ovalada. Su labio interno se proyecta sobre la última espira originando una callosidad blanquecina. El labio externo es fino y liso en individuos juveniles pero grueso y provisto de una fila radial de dientes en ejemplares más longevos. El canal sifonal es corto, profundo y oblicuo.

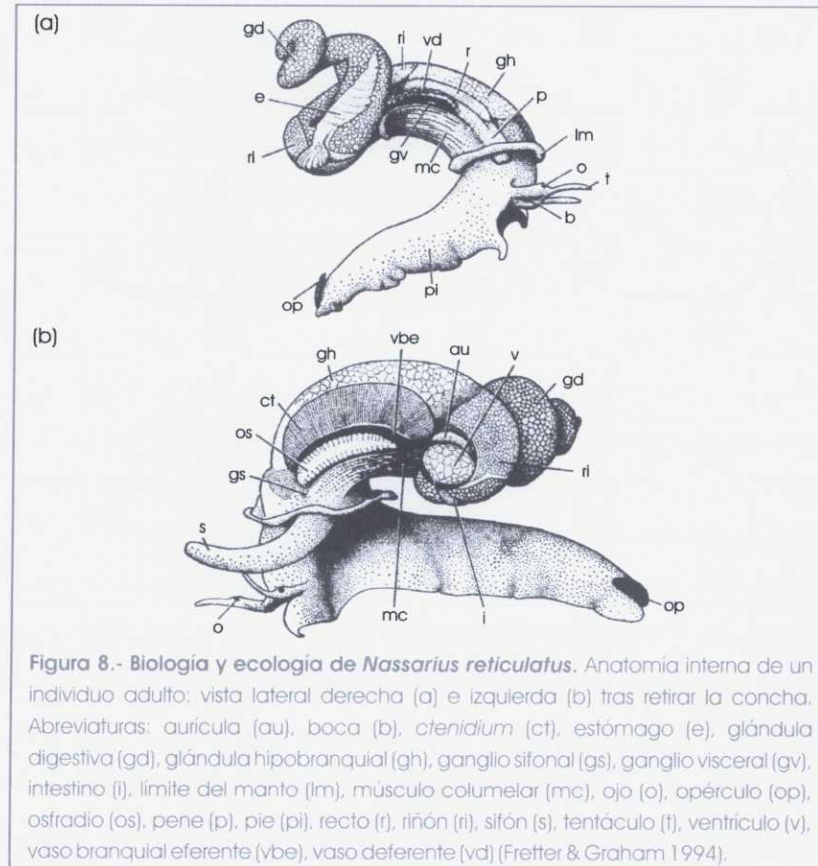


Figura 7.- Biología y ecología de *Nassarius reticulatus*. Aspecto general de la concha de un individuo adulto.

La anatomía interna de *Nassarius reticulatus*, al igual que la de los restantes neogasterópodos, está caracterizada por la supresión total de órganos en la parte derecha del organismo (Fig. 8, Fretter & Graham 1994): el corazón presenta una única aurícula (monotocardio) y la branquia (*ctenidium*) tan sólo muestra filamentos a un lado de su eje central (monopectinada). El cuerpo del animal puede definirse como un gran pie muscular sobre el cuál se asientan cabeza y masa visceral. La primera de dichas estructuras alberga un par de tentáculos en los que se sitúan los ojos y una probóscide retraíble que constituye el inicio del aparato digestivo. En la masa visceral se encuentran el estómago, glándula digestiva, intestino, riñón, corazón y gónada. Cabe destacar además la existencia de un sifón (originado a partir de un pliegue del margen paleal anterior) y un osfradio (un sofisticado órgano olfativo situado a continuación de la branquia en el interior de la cavidad del manto).

Esta especie es considerada con frecuencia un necrófago obligado (Davenport & Moore 2002). Los individuos juveniles exhiben fundamentalmente hábitos detritívoros, mientras que los adultos mues-

tran preferencia por carroña de mayor tamaño (Tallmark 1980). Los ejemplares maduros permanecen la mayor parte del tiempo enterrados en el sustrato, a escasos centímetros de la superficie, pero responden en cuestión de segundos a estímulos olfativos indicativos de la presencia de carroña. Emergen entonces del sedimento viajando distancias de varios metros hasta alcanzar el alimento e ingieren, en pocos minutos, cantidades considerables de éste en relación con su tamaño corporal (Crisp et al. 1978). La anterior respuesta sólo tiene lugar en individuos que no se han alimentado durante periodos de tiempo relativamente largos (Crisp 1978) y ésta no se produce cuando el estímulo tiene su origen en un ejemplar coespecífico (Davenport & Moore 2002); comportamientos que minimizan claramente el riesgo de predación.

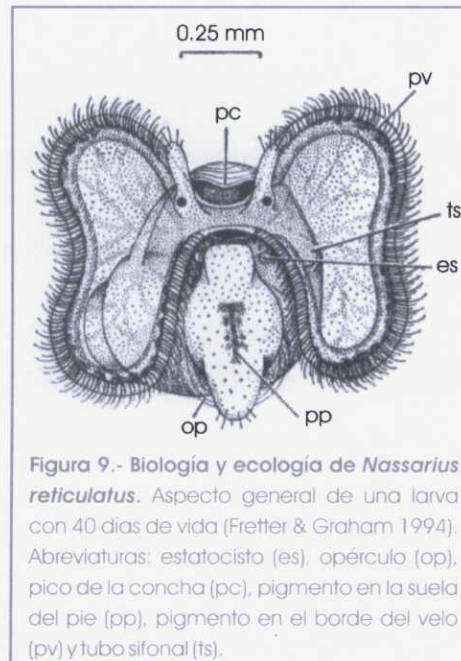


Los sexos en *Nassarius reticulatus* están separados y son permanentes a lo largo de la vida del individuo (i.e. especie dioica). Los machos exhiben un pene de longitud considerable, un testículo anaranjado y una vesícula seminal blanquecina profusamente convolucionada. Por su parte, las hembras pueden identificarse claramente por la presencia de una glándula de la cápsula blanca y distendida que exhibe en su región anterior una mancha conspicua de color rosado; el ovario es pardo y el oviducto, de igual coloración, recto. El ciclo reproductivo de esta especie exhibe un claro patrón estacional que afecta no sólo a la maduración de las gónadas sino también a los caracteres anteriores (Barroso & Moreira 1998). Durante el periodo de reposo sexual, vesícula seminal y glándula de la cápsula pueden pasar totalmente inadvertidas, las gónadas (ovario y testículo) muestran menor extensión y se confunden con la glándula digestiva y, además, el pene también parece reducir su longitud.

En latitudes templadas, la gametogénesis se inicia a finales del verano y la puesta comienza en los últimos meses del invierno (febrero-marzo), asociada probablemente a un incremento en la temperatura del agua (Barroso & Moreira 1998). El desarrollo es indirecto (Lebour 1931):

- Las cápsulas de huevos son fijadas a un sustrato duro. Miden aproximadamente 5 mm de diámetro y contienen una media de 250 huevos. Su morfología es lenticular con una cara plana y otra ligeramente convexa. Presentan una apertura (inicialmente ocluida) en el extremo superior y una base adhesiva ancha. El tiempo requerido para que las larvas completen su desarrollo en el interior de la cápsula está íntimamente relacionado con la temperatura del agua. A 12 °C son necesarios 24 días, a 16 °C dicho periodo se reduce a dos semanas y para una temperatura de 20 °C la eclosión tiene lugar en tan sólo 12 días (Tallmark 1980). No existen huevos nutricos de manera que, bajo condiciones óptimas, todos los embriones completen su desarrollo.
- Las larvas recién eclosionadas miden aproximadamente 300 µm y presentan una concha no esculpida. El velo es bilobulado y transparente, si bien presenta una pigmentación oscura en su borde externo. Los ojos se sitúan en la base de unos pequeños tentáculos y resulta posible observar a través de la concha los órganos internos (boca, esófago, estómago –ciliado y con su contenido en continuo movimiento–, intestino y ano). Estas larvas se alimentan de fitoplancton y

parecen estar restringidas a las capas más superficiales de agua (i.e. 5-10 metros de profundidad, Fretter & Shale 1973). Protoconcha, pie y velo incrementan su tamaño durante las primeras semanas de vida. Además, esta última estructura también sufre modificaciones morfológicas: aparece una indentación central en cada lóbulo que aumenta su profundidad gradualmente. De esta manera, tras 25 días, las larvas exhiben un velo tetralobulado y la concha presenta ya 2-3 espiras (Fig. 9).



- Con 6 semanas el pie se encuentra totalmente desarrollado y es similar en morfología al de un adulto. Las larvas, que superan ya el milímetro de longitud, alternan periodos de natación activa con otros de reposo sobre el fondo. Finalmente, se inicia la reabsorción del velo. Es probable sin embargo que la degradación completa no tenga lugar hasta que el individuo encuentra un sustrato adecuado sobre el que asentarse (e.g. con un contenido elevado en materia orgánica, Tallmark 1980). De nuevo, el periodo de tiempo transcurrido desde la eclosión hasta la me-

tamorfosis y asentamiento está íntimamente relacionado con la temperatura del agua (Tallmark 1980).

El crecimiento de la especie es rápido durante los tres primeros años de vida pero desciende de modo abrupto cuando los individuos alcanzan la madurez sexual (alrededor de los 48 meses) (Tallmark 1980). Por otra parte, la mortalidad es muy elevada durante la fase planctónica pero baja entre los ejemplares maduros pues apenas presentan depredadores y han desarrollado comportamientos que favorecen su evitación (e.g. los periodos de mayor actividad ocurren durante la marea alta o durante la noche). En consecuencia, este animal puede llegar a vivir 15 años (Tallmark 1980). Pese a todo, el parasitismo por trematodos en ciertas localidades puede representar una causa importante de mortalidad en la población adulta (Tallmark & Norrgren 1976, Tallmark 1980); ocasiona castración y, además, los individuos afectados son más susceptibles al estrés ambiental (e.g. salino o térmico).

3.2. VENTAJAS DE *NASSARIUS RETICULATUS* COMO ORGANISMO MODELO

3.2.1. *NASSARIUS RETICULATUS* Y EL ESTUDIO DE LA DISPERSIÓN

Puesto que reunir datos sobre la estructura genética de poblaciones de todas las especies resulta cuando menos costoso en recursos y tiempo, se ha recomendado en este tipo de trabajos (al igual que en otros muchos estudios) emplear organismos modelo (Palumbi et al. 2003). Dichos organismos se caracterizan por carecer de valor económico o para la conservación pero, en contrapartida, resultan fáciles de estudiar dada su abundancia. Además, la ausencia de valor económico representa una segunda ventaja ya que se elimina, al menos en parte, el peligro de que la estructura inferida esté influenciada por la acción humana (e.g. el trasvase de individuos con fines comerciales puede ocasionar que se concluya una conectividad elevada entre poblaciones genéticamente aisladas).

En este sentido, *Nassarius reticulatus* (L.) es un gasterópodo prosobranquio marino que, no sólo carece de valor económico y para la conservación, sino que también presenta otras características

que lo convierten en una especie particularmente útil en estudios de genética de poblaciones. Como se indica más arriba, es un organismo común a lo largo de las costas europeas (Fretter & Graham 1985); puede así emplearse en estudios regionales pero también en aquéllos cuya finalidad es revelar patrones que actúan a una escala geográfica relativamente amplia, tanto actuales (e.g. corrientes oceanográficas) como históricos (e.g. glaciaciones). Además, es especialmente abundante en el intermareal blando lo que hace posible capturar a mano un número elevado de individuos simplemente con la ayuda de un cebo. Su amplia tolerancia a variaciones en la salinidad y temperatura (Eriksson & Tallmark 1974) permite mantenerlo en condiciones de laboratorio durante periodos relativamente largos. Finalmente, tanto su ciclo reproductivo como sus fases larvarias se han descrito con detalle. Exhibe un ciclo reproductivo con un patrón estacional bien definido (Barroso & Moreira 1998) y su capacidad potencial de dispersión es elevada pues de las cápsulas bénticas eclosionan larvas velígeras que forman parte del plancton durante 1-2 meses hasta la metamorfosis (Lebour 1931).

3.2.2. *NASSARIUS RETICULATUS* Y LA BIOMONITORIZACIÓN DEL TBT

Los gasterópodos prosobranquios constituyen un grupo eminentemente marino de extraordinaria riqueza específica. Sus numerosas especies contribuyen a una fracción considerable de la biodiversidad y juegan papeles ecológicos importantes en numerosos ecosistemas (e.g. actúan como especies clave o representan una fracción significativa de la biomasa de distintos niveles tróficos). A pesar de su relevancia, han recibido escasa atención como modelos de estudio en ecotoxicología pues con frecuencia presentan ciclos vitales largos que hacen difícil mantener *stocks* saludables en condiciones de laboratorio (Oehlmann et al. 2007). Sin embargo, este grupo ha mostrado gran utilidad en estudios de biomonitorización y ha sido usado con éxito para inferir la calidad de distintos ecosistemas (Oehlmann & Schulte-Oehlmann 2003). Un ejemplo paradigmático de dicha utilidad, que ha recibido considerable atención en las últimas dos décadas, puede encontrarse en la contaminación por compuestos organoestánicos, principalmente TBT.

Al igual que ocurre en otros gasterópodos prosobranquios, las hembras de *Nassarius reticulatus*

desarrollan órganos sexuales masculinos ante la contaminación por TBT. La incidencia y características del imposex en esta especie fueron investigadas por primera vez a principios de la década de 1990 (Stroben et al. 1992b, 1992a). Dichas investigaciones revelaron que este organismo resultaba de gran utilidad en estudios de biomonitorización. Es más, su empleo podía aventajar en algunos casos a la especie bioindicadora por excelencia de las costas europeas, *Nucella lapillus*, dada su menor sensibilidad y requerimientos ecológicos. Desde entonces y hasta la actualidad, varios estudios a lo largo del rango geográfico de esta especie han corroborado su utilidad a fin de monitorizar los niveles ambientales de TBT y su evolución temporal: Suecia (Magnusson & Granmo 2004), Inglaterra (Bryan et al. 1993), Francia (Huet et al. 1995, Wirzinger et al. 2007), España (Barreiro et al. 2001, Ruiz et al. 2005, Gomez-Ariza et al. 2006), Portugal (Pessoa et al. 2001, Barroso et al. 2002, Santos et al. 2004, Barroso et al. 2005, Sousa et al. 2005, Rato et al. 2006) o Italia (Berto et al. 2006).

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott A, Abel PD, Arnold DW, Milne A (2000) Cost-benefit analysis of the use of TBT: the case for a treatment approach. *Sci Tot Environ* 258: 5-19
- Abel PD (2000) TBT-towards a better way to regulate pollutants. *Sci Tot Environ* 258:1-4
- Adelman D, Hinga KR, Pilson MEQ (1990) Biogeochemistry of butyltins in an enclosed marine ecosystem. *Environ Sci Technol* 24: 1027-1032
- Alberto F, Santos R, Leitao JM (1999) Assessing patterns of geographic dispersal of *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) through RAPD differentiation of populations. *Mar Ecol Prog Ser* 191:101-108
- Alzieu C (1991) Environmental problems caused by TBT in France: assessment, regulations, prospects. *Mar Environ Res* 32: 7-17
- Alzieu C (2000) Environmental impact of TBT: the french experience. *Sci Tot Environ* 258:99-102
- Alzieu C, Heral M, Thibaud Y, Dardignac MJ, Feuillet M (1982) Influence des peintures antisalissures a base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huître *Crassostrea gigas*. *Rev Trav Inst Peches Marit* 45: 101-116
- André C, Lindegarth M, Jonsson PR, Sundberg P (1999) Species identification of bivalve larvae using random amplified polymorphic DNA (RAPD): differentiation between *Cerastoderma edule* and *C. lamarcki*. *J Mar Biol Ass U K* 79: 563-565
- Anzizar I, Herrera M, Rohde W, Santos A, Dowe JL, Goikoetxea P, Ritter E (1998) Studies on the suitability of RAPD and ISTR for identification of palm species (*Areaceae*). *Taxon* 47: 635-645
- Arndt A, Smith MJ (1998) Genetic diversity and population structure in two species of sea cucumber: differing patterns according to mode of development. *Mol Ecol* 7: 1053-1064
- Aubert H, Lightner DV (2000) Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the Gulf of California, Mexico. *Mar Biol* 137: 875-885
- Avise JC (1992) Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos* 63: 62-76
- Avise JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York
- Avise JC, Lansman RA, Shade RO (1979) Use of Restriction Endonucleases to Measure Mitochondrial-DNA Sequence Relatedness in Natural-Populations. 1. Population-Structure and Evolution in the Genus *Peromyscus*. *Genetics* 92: 279-295
- Axiak V, Vella AJ, Micaleff D, Chircop P (1995) Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. *Mar Biol* 121: 685-692
- Bandeira SO, Nilsson PG (2001) Genetic population structure of the seagrass *Thalassodendron ciliatum*

- in sandy and rocky habitats in southern Mozambique. *Mar Biol* 139: 1007-1012
- Banno K, Ishikawa H, Hamazu Y, Tabira H (1999) Identification of a RAPD marker linked to the susceptible gene of black spot disease in Japanese pear. *J Jap Soc Hortic Sci* 68: 476-481
- Barber PH, Palumbi SR, Erdmann MV, Moosa MK (2002) Sharp genetic breaks among populations of *Haptosquilla pulchella* (Stomatopoda) indicate limits to larval transport: patterns, causes, and consequences. *Mol Ecol* 11: 659-674
- Barker NP, Kruger LY, Vlok JH, Harley EH (1996) RAPD suggest the Gramkapoort *Aloe* to be of hybrid origin. *South Africa Journal of Botany* 62: 292-295
- Barreiro R, González R, Quintela M, Ruiz JM (2001) Imposex, organotin bioaccumulation and sterility of female *Nassarius reticulatus* in polluted areas of NW Spain. *Mar Ecol Prog Ser* 218: 203-212
- Barreiro R, Quintela M, Bárbara Criado IM, Cremades Ugarte J (2006) RAPD differentiation between an invasive and a native species of *Grateloupia* (Rhodophyta) in Galicia (NW Spain). *Phycologia* 45: 213-217
- Barreiro R, Quintela M, Ruiz JM (1999) Aphally and imposex in *Nucella lapillus* from Galicia (NW Spain): incidence, geographical distribution and consequences for the biomonitoring of TBT contamination. *Mar Ecol Prog Ser* 185: 229-238
- Barroso CM, Moreira MH (1998) Reproductive cycle of *Nassarius reticulatus* in the Ria de Aveiro, Portugal: implications for imposex studies. *J Mar Biol Ass U K* 78: 1233-1246
- Barroso CM, Moreira MH, Bebianno MJ (2002) Imposex, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* (L.) from the Portuguese coast. *Mar Ecol Prog Ser* 230: 127-135
- Barroso CM, Reis-Henriques MA, Ferreira MS, Gibbs PE, Moreira MH (2005) Organotin contamination, imposex and androgen/oestrogen ratios in natural populations of *Nassarius reticulatus* along a ship density gradient. *Appl Organomet Chem* 19: 1141-1148
- Batley G (1996) The distribution and fate of tributyltin in the marine environment. In: de Mora SJ (ed) *Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant*. Cambridge University Press, Cambridge, p 139-166
- Batley GE, Fuhua C, Brockbank CI, Flegg KJ (1989) Accumulation of tributyltin by the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*. *Aust J Mar Freshw Res* 40: 49-54
- Bauert MR, Kälin M, Baltisberger M, Edwards PJ (1998) No genetic variation detected within isolated relict populations of *Saxifraga cernua* in the Alps using RAPD markers. *Mol Ecol* 7: 1519-1527
- Bech M (1999) Increasing Levels of Tributyltin-Induced Imposex in Muricid Gastropods at Phuket Island, Thailand. *Appl Organomet Chem* 13: 799-804
- Bech M (2002a) Imposex and tributyltin contamination as a consequence of the establishment of a marina, and increasing yachting activities at Phuket Island, Thailand. *Environ Pollut* 117: 421-429
- Bech M (2002b) A survey of imposex in muricids from 1996 to 2000 and identification of optimal indicators of tributyltin contamination along the east coast of Phuket Island, Thailand. *Mar Pollut Bull* 44: 887-896
- Belaj A, Trujillo I, Rallo L (1999) Marcadores de ADN para la identificación de variedades del olivo. *Agricultura* 799: 166-167

- Bennett RF (1996) Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. In: de Mora SJ (ed) Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant. Cambridge University Press, Cambridge, p 21-61
- Bentzen P, Taggart CT, Ruzzante DE, Cook D (1996) Microsatellite polymorphism and the population structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the northwest Atlantic. Can J Fish Aquat Sci 53: 2706-2721
- Bernardi G (2000) Barriers to gene flow in *Embiotoca jacksoni*, a marine fish lacking a pelagic larval stage. Evolution 54: 226-237
- Berto D, Boscolo R, Cacciatore F, Giani M (2006) Organotins used in antifouling paints: environmental impact and contamination in a case study (Southern Venice Lagoon). International Journal of Oceanography and Hydrobiology 35: 269-283
- Bettin C, Oehlmann J, Stroben E (1996) TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. Helgol Meeresunters 50: 299-317
- Birchenough AC, Barnes CS, Evans SM, Hinz H, Krönke I, Moss C (2002) A review and assessment of tributyltin contamination in the North Sea, based on surveys of butyltin tissue burdens and imposex/intersex in four species of neogastropods. Mar Pollut Bull 44: 534-543
- Blaber SJM (1970) The occurrence of a penis-like out-growth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). Proc Malacol Soc London 39: 231-233
- Bohonak AJ (1999) Dispersal, gene flow, and population structure. Q Rev Biol 74: 21-45
- Bosselmann K (1996) Environmental law and tributyltin in the environment. In: de Mora SJ (ed) Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant. Cambridge University Press, Cambridge, p 237-263
- Botsford LW, Micheli F, Hastings A (2003) Principles for the design of marine reserves. Ecol Appl 13: S25-S31
- Bright DA, Ellis DV (1990) A comparative survey of imposex in Northeast Pacific neogastropods (Prosobranchia) related to tributyltin contamination, and choice of a suitable bioindicator. Can J Zool 68: 1915-1924
- Bryan GW, Burt GR, Gibbs PE, Pascoe PL (1993) *Nassarius reticulatus* (Nassariidae: Gastropoda) as an indicator of tributyltin pollution before and after TBT restrictions. J Mar Biol Ass U K 73: 913-929
- Bryan GW, Gibbs PE, Burt GR, Hummerstone LG (1987) The effects of tributyltin (TBT) accumulation on adult dogwhelks, *Nucella lapillus*: long-term field and laboratory experiments. J Mar Biol Ass U K 67: 525-544
- Bryan GW, Gibbs PE, Hugget RJ, Curtis LA, Bailey DS, Dauer DM (1989) Effects of tributyltin pollution on the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*, from the York River and Sarah Creek, Chesapeake Bay. Mar Pollut Bull 20: 458-462
- Bryan GW, Gibbs PE, Hummerstone LG, Burt GR (1986) The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around South-West England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. J Mar Biol Ass U K 66: 611-640
- Burton RS, Tegner MJ (2000) Enhancement of red abalone *Haliotis rufescens* stocks at San Miguel Island: reassessing a success story. Mar Ecol Prog Ser 202: 303-308

- Caley MJ, Carr MH, Hixon MA, Hughes TP, Jones GP, Menge BA (1996) Recruitment and the local dynamics of open marine populations. *Annu Rev Ecol Syst* 27: 477-500
- Cardoso MA, Provan J, Powell W, Ferreira PCG, de Oliveira DE (1998) High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Mol Ecol* 7: 601-608
- Carlson JE, Tulsieram LK, Glaubitz JC, Luk VWK, Kauffeldt C, Rutledge R (1991) Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theor Appl Genet* 83: 194-200
- Castillo AGF, Martinez JL, Garcia-Vazquez E (2004) Fine spatial structure of Atlantic hake (*Merluccius merluccius*) stocks revealed by variation at microsatellite loci. *Mar Biotechnol* 6: 299-306
- Castro LFC, Lima D, Machado A, Melo C, Hiromori Y, Nishikawa J, Nakanishi T, Reis-Henriques MA, Santos MM (2007) Imposex induction is mediated through the Retinoid X Receptor signalling pathway in the neogastropod *Nucella lapillus*. *Aquat Toxicol* 85: 57-66
- Cleary JJ, Stebbing ARD (1987) Organotin in the surface microlayer and subsurface waters of South West England. *Mar Pollut Bull* 18: 238-246
- Crisp M (1978) Effects of feeding on the behaviour of *Nassarius* species (Gastropoda: prosobranchia). *J Mar Biol Ass U K* 58: 659-669
- Crisp M, Davenport J, Shumway SE (1978) Effects of feeding and of chemical stimulation on the oxygen uptake of *Nassarius reticulatus* (Gastropoda: Prosobranchia). *J Mar Biol Ass U K* 58: 387-399
- Crossland S, Coates D, Grahame J, Mill PJ (1993) Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in separating two sibling species of *Littorina*. *Mar Ecol Prog Ser* 96: 301-305
- Curtis LA, Kinley JL (1998) Imposex in *Ilyanassa obsoleta* still common in a Delaware estuary. *Mar Pollut Bull* 36: 97-101
- Champ MA (2000) A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Sci Tot Environ* 258: 21-71
- Champ MA, Pugh L (1987) Tributyltin antifouling paints: introduction and overview. In: Proceedings OCEANS'87, Organotin Symposium. Institut of Electric and Electronics Engineers, New York, p 1296-1308
- Champ MA, Seligman PF (1996) Organotin: Environmental Fate and Effects. Chapman & Hall, London
- Chiavarini S, Massanisso P, Nicolai P, Nobili C, Morabito R (2003) Butyltins concentration levels and imposex occurrence in snails from the Sicilian coasts (Italy). *Chemosphere* 50: 311-319
- Cho HS, Seol SW, Horiguchi T (2006) Less recovery from imposex and organotin pollution in the rock shell, *Thais clavigera* in Korea *Mar Environ Res* 62: S224
- Davenport J, Moore PG (2002) Behavioural responses of the netted dogwhelk *Nassarius reticulatus* to olfactory signals derived from conspecific and nonconspecific carrion. *J Mar Biol Ass UK* 82: 967-969
- Dawson IK, Simons AJ, Waugh R, Powell W (1996) Detection and pattern of interspecific hybridization between *Gliricida sepium* and *G. maculata* in Meso-America revealed by PCR-based assays. *Mol Ecol* 5: 89-98
- de Mora SJ (1996) The tributyltin debate: ocean transportation versus seafood harvesting. In: de Mora SJ (ed) Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant. Cambridge University Press, Cam-

bridge, p 1-20

- de Wolf H, Backeljau T, Verhagen R (1998) Congruence between allozyme and RAPD data in assessing macrogeographical genetic variation in the periwinkle *Littorina striata* (Mollusca, Gastropoda). *Heredity* 81: 486-492
- Douglas EW (1993) Assessments of imposex in the dogwhelk (*Nucella lapillus*) and tributyltin along the NE coast of England. *Invertebr Reprod Dev* 24: 243-248
- Dowson PH, Bubbs JM, Lester JN (1994) The effectiveness of the 1987 retail ban on TBT based antifouling paints in reducing butyltin concentrations in East Anglia, UK. *Chemosphere* 28: 905-910
- Dutcher JA, Kapraun DF (1994) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) identification of genetic variation in three species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *J Appl Phycol* 6: 267-273
- Dyrinda EA (1992) Incidence of abnormal shell thickening in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Poole Harbour (UK), subsequent to the 1987 TBT restrictions. *Mar Pollut Bull* 24: 156-163
- Engelen AH, Olsen JL, Breeman AM, Stam WT (2001) Genetic differentiation in *Sargassum polyceratum* (Fucales: Phaeophyceae) around the island of Curaçao (Netherlands Antilles). *Mar Biol* 139: 267-277
- Eriksson S, Tallmark B (1974) The influence of environmental factors on the diurnal rhythm of the prosobranch gastropod *Nassarius reticulatus* (L.) from a non-tidal area. *Zoon* 2: 135-142
- Evans SM, Barnes N, Birchenough AC, Brancato MS, Hardman E (2001) Tributyltin contamination in two estuaries and adjacent ocean coasts: Puget sound, Washington, and Narragansett Bay, Rhode Island (USA). *Invertebr Reprod Dev* 39: 221-229
- Evans SM, Birchenough AC, Brancato MS (2000) The TBT ban: Out of the frying pan into the fire? *Mar Pollut Bull* 40: 204-211
- Evans SM, Dawson M, Day J, Frid CLJ, Gill ME, Pattisina LA, Porter J (1995) Domestic waste and TBT pollution in coastal areas of Ambon Island (Eastern Indonesia). *Mar Pollut Bull* 30: 109-115
- Evans SM, Evans PM, Leksono T (1996) Widespread recovery of dogwhelks, *Nucella lapillus* (L.), from tributyltin contamination in the North Sea and Clyde Sea. *Mar Pollut Bull* 32: 263-269
- Evans SM, Nicholson GJ, Browning C, Hardman E, Seligman O, Smith R (1998) An assessment of tributyltin contamination in the North-Atlantic using imposex in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) as a biological indicator of TBT pollution. *Invertebr Reprod Dev* 34: 277-287
- Exadactylos A, Geffen AJ, Panagiotaki P, Thorpe JP (2003) Population structure of Dover sole *Solea solea*: RAPD and allozyme data indicate divergence in European stocks. *Mar Ecol Prog Ser* 246: 253-264
- Faugeron S, Valero M, Destombe C, Martinez EA, Correa JA (2001) Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *J Phycol* 37: 705-716
- Fazio G, Stevens MR, Scott JW (1999) Identification of RAPD markers linked to fusarium crown and root rot resistance (Frl) in tomato. *Euphytica* 105: 205-210
- Fent K (1996) Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit Rev Toxicol* 26: 1-117
- Féral J-P (2002) How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *J Exp Mar Biol Ecol* 268: 121-145

- Fernandez MA, de Luca Rebello Wagener A, Limaverde AM, Scofield AL, Pinheiro FM, Rodrigues E (2004) Imposex and surface sediment speciation: A combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Mar Environ Res* 59: 435-452
- Fioroni P, Oehlmann J, Stroben E (1991) The pseudohermaphroditism of prosobranchs: morphological aspects. *Zool Anz* 226: 1-26
- Folviksrk N, Berge JA, Brevik EM, Walday M (1999) Quantification of organotin compounds and determination of imposex in populations of dogwhelks (*Nucella lapillus*) from Norway. *Chemosphere* 38: 681-691
- Fretter V, Graham A (1985) The prosobranch molluscs of Britain and Denmark. Part 8. Neogastropoda. *J Molluscan Stud*: 435-556
- Fretter V, Graham A (1994) British Prosobranch Molluscs: Their Functional Anatomy and Ecology. Ray Society, London
- Fretter V, Shale D (1973) Seasonal-changes in population density and vertical distribution of prosobranch veligers in offshore plankton at Plymouth. *J Mar Biol Ass U K* 53: 471-492
- Galante-Oliveira S, Langston WJ, Burt GR, Pereira ME, Barroso CM (2006) Imposex and organotin body burden in the dog-whelk (*Nucella lapillus* L.) along the Portuguese coast. *Appl Organomet Chem* 20: 1-4
- Geller JB, Walton ED, Grosholz ED, Ruiz GM (1997) Cryptic invasions of the crab *Carcinus* detected by molecular phylogeography. *Mol Ecol* 6: 901-906
- Gemas VJ, RijoJohansen MJ, Tenreiro R, Fevereiro P (2000) Inter- and intra-varietal analysis of three *Olea europaea* L. cultivars using the RAPD technique. *J Hort Sci Biotechnol* 75: 312-319
- Gibbs PE, Bebianno MJ, Coelho MR (1997) Evidence of the differential sensitivity of neogastropods to tributyltin (TBT) pollution, with notes on a species (*Columbella rustica*) lacking the imposex response. *Environ Technol* 18: 1219-1224
- Gibbs PE, Bryan GW (1986) Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. *J Mar Biol Ass U K* 66: 767-777
- Gibbs PE, Bryan GW (1996) TBT-induced imposex in neogastropod snails: masculinization to mass extinction. In: de Mora SJ (ed) Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant. Cambridge University Press, Cambridge, p 212-236
- Gibbs PE, Bryan GW, Pascoe PL, Burt GR (1987) The use of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *J Mar Biol Ass UK* 67: 507-523
- Gibbs PE, Bryan GW, Spence S (1991a) The impact of tributyltin (TBT) pollution on the *Nucella lapillus* (Gastropoda) populations around the coast of South-East England. *Oceanol Acta Esp*: 257-261
- Gibbs PE, Pascoe PL, Burt GR (1988) Sex change in the female dog-whelk, *Nucella lapillus*, induced by tributyltin from antifouling paints. *J Mar Biol Ass UK* 68: 715-731
- Gibbs PE, Spencer BE, Pascoe PL (1991b) The american oyster drill, *Urosalpinx cinerea* (Gastropoda): evidence of decline in an imposex-affected population (R. Blackwater, Essex). *J Mar Biol Ass UK* 71: 827-838
- Gibson CP, Wilson SP (2002) Imposex still evident in eastern Australia 10 years after tributyltin restrictions. *Mar Environ Res* 55: 101-112

- Goldson AJ, Hughes RN, Gliddon CJ (2001) Population genetic consequences of larval dispersal mode and hydrography: a case study with bryozoans. *Mar Biol* 138: 1037-1042
- Gomes C, Dales RBG, Oxenford HA (1998) The application of RAPD markers in stock discrimination of the four-wing flyingfish, *Hirundichthys affinis* in the central western Atlantic. *Mol Ecol* 7: 1029-1039
- Gomez-Ariza JL, Santos MM, Morales E, Giraldez I, Sanchez-Rodas D, Vieira N, Kemp JF, Boon JP, Ten-Hallers-Tjabbes CC (2006) Organotin contamination in the Atlantic Ocean off the Iberian Peninsula in relation to shipping. *Chemosphere* 64: 1100-1108
- Gooding M, Gallardo C, Leblanc G (1999) Imposex in three marine gastropod species in Chile and potential impact on muriciculture. *Mar Pollut Bull* 38: 1227-1231
- Gooding MP, LeBlanc GA (2002) Identification of a novel mechanism by which tributyltin may elevate testosterone levels in the mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). *Mar Environ Res* 54: 742
- Gouin N, Grandjean F, Bouchon D, Reynolds JD, Souty-Grosset C (2002) Population genetic structure of the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes*, assessed using RAPD markers. *Heredity* 87: 80-87
- Graham J, Squire GR, Marshall B, Harrison RE (1997) Spatially dependent genetic diversity within and between colonies of wild raspberry *Rubus idaeus* detected using RAPD markers. *Mol Ecol* 6:1001-1008
- Grosberg RK, Levitan DR, Cameron BB (1996) Characterization of genetic structure and genealogies using RAPD-PCR markers: a random primer for the novice and nervous. In: Ferraris JD, Palumbi SR (eds) *Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols*. Wiley-Liss, New York, p 67-100
- Hadrys H, Balick M, Schierwater B (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol* 1: 55-63
- Haig SM, Rhymer JM, Heckel DG (1994) Population differentiation in randomly amplified polymorphic DNA of red-cockaded woodpeckers *Picoides borealis*. *Mol Ecol* 3: 581-595
- Harding MJC, Rodger GK, Davies IM, Moore JJ (1997) Partial recovery of the dogwhelk (*Nucella lapillus*) in Sullom Voe, Shetland from tributyltin contamination. *Mar Environ Res* 44: 285-304
- Hatton-Ellis TW, Noble LR, Okamura B (1998) Genetic variation in a freshwater bryozoan. I: Populations in the Thames basin, U.K. *Mol Ecol* 7: 1575-1585
- Haymes KM, Van de Weg WE, Arens P, Maas JL, Vosman B, Den Nijs APM (2000) Development of SCAR markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene and their assessment in European and North American strawberry genotypes. *J Amer Soc Hort Sci* 125: 330-339
- Heipel DA, Bishop JDD, Brand AR, Thorpe JP (1998) Population genetic differentiation of the great scallop *Pecten maximus* in western Britain investigated by randomly amplified polymorphic DNA. *Mar Ecol Prog Ser* 162: 163-171
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol J Linn Soc* 68: 87-112
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-914
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil Trans R Soc Lond B* 359: 183-195
- Holmes SP, Dekker R, Williams ID (2004) Population dynamics and genetic differentiation in the bivalve mollusc *Abra tenuis*: aplanic dispersal. *Mar Ecol Prog Ser* 268: 131-140

- Holmes SP, Witbaard R, Meer Jvd (2003) Phenotypic and genotypic population differentiation in the bivalve mollusc *Arctica islandica*: results from RAPD analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 254: 163-176
- Horiguchi T, Hyeon-Seo C, Shiraishi H, Shibata Y, Soma M, Morita M, Shimizu M (1998) Field studies on imposex and organotin accumulation in the rock shell, *Thais clavigera*, from the Seto Inland Sea and the Sanriku region, Japan. *Sci Tot Environ* 214: 65-70
- Horiguchi T, Li Z, Uno S, Shimizu M, Shiraishi H, Morita M, Thompson JAJ, Levings CD (2004) Contamination of organotin compounds and imposex in molluscs from Vancouver, Canada. *Mar Environ Res* 57: 75-88
- Horiguchi T, Shiraishi H, Shimizu M, Masatoshi M (1997) Imposex in sea snails, caused by organotin (tributyltin and triphenyltin) pollution in Japan: a survey. *Appl Organomet Chem* 11: 451-455
- Horiguchi T, Shiraishi H, Shimizu M, Yamazaki S, Morita M (1995) Imposex in Japanese gastropods (Neogastropoda and Mesogastropoda): Effects of Tributyltin and Triphenyltin from antifouling paints. *Mar Pollut Bull* 31: 402-405
- Horiguchi T, Takiguchi N, Cho HS, Kojima M, Kaya M, Shiraishi H, Morita M, Hirose H, Shimizu M (2000) Ovo-testis and disturbed reproductive cycle in the giant abalone, *Haliotis madaka*: possible linkage with organotin contamination in a site of population decline. *Mar Environ Res* 50: 223-229
- Houston RS (1971) Reproductive biology of *Thais emarginata* (Deshayes, 1939) and *Thais canaliculata* (Duclos, 1832). *Veliger* 13: 348-357
- Huang BX, Peakall R, Hanna PJ (2000) Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) populations using RAPD, minisatellite and microsatellite markers. *Mar Biol* 136: 207-216
- Huet M, Fioroni P, Oehlmann J, Stroben E (1995) Comparison of imposex response in three prosobranch species. *Hydrobiologia* 309: 29-35
- Huet M, Paulet YM, Clavier J (2004) Imposex in *Nucella lapillus*: A ten year survey in NW Brittany. *Mar Ecol Prog Ser* 270: 153-161
- Huet M, Paulet YM, Glémagrec M (1996) Tributyltin (TBT) pollution in the coastal waters of West Brittany as indicated by imposex in *Nucella lapillus*. *Mar Environ Res* 41: 157-167
- Huff DR, Quinn JA (1998) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among native little bluestem [*Schizachyrium scoparium* (Michx.) Nash] populations from sites of high and low fertility in forest and grassland biomes. *Mol Ecol* 7: 1591-1597
- Huggett RJ, Evan DA, MacIntyre WG, Unger MA, Seligman PF, Hall LW, Jr. (1996) Tributyltin concentration in waters of the Chesapeake Bay. In: Champ MA, Seligman PF (eds) *Organotin*. Chapman & Hall, London, UK, p 485-501
- Hung TC, Hsu WK, Mang PJ, Chuang A (2001) Organotins and imposex in the rock shell, *Thais clavigera*, from oyster mariculture areas in Taiwan. *Environ Pollut* 112: 145-152
- Hunt GJ, Page RE, Jr. (1992) Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. *Theor Appl Genet* 85: 15-20
- Jackson JBC, Kirby MX, Berger WH, Bjorndal KA, Botsford LW, Bourque BJ, Bradbury RH, Cooke R, Erlandson J, Estes JA, Hughes TP, Kidwell S, Lange CB, Lenihan HS, Pandolfi JM, Peterson CH, Steneck RS, Tegner MJ, Warner RR (2001) Historical Overfishing and the Recent Collapse of Coastal Eco-

systems. *Science* 293: 629-637

- Janer G, Lyssimachou A, Bachmann J, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Porte C (2006) Sexual dimorphism in esterified steroid levels in the gastropod *Marisa cornuarietis*: the effect of xenoandrogenic compounds. *Steroids* 71: 435-444
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985a) Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985b) Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 316: 76-79
- Jiménez JF, Sánchez-Gómez P, Gueemes J, Werner O, Rossello JA (2002) Genetic variability in a narrow endemic snapdragon (*Antirrhinum subbaeticum*, Scrophulariaceae) using RAPD markers. *Heredity* 89: 387-393
- Johnson MS, Black R (1995) Neighbourhood size and the importance of barriers to gene flow in an intertidal snail. *Heredity* 75: 142-154
- Jordano P, Godoy JA (2000) RAPD variation and population genetic structure in *Prunus mahaleb* (Rosaceae), an animal-dispersed tree. *Mol Ecol* 9: 1293-1305
- Kohn AJ, Almasi KN (1993) Imposex in australian *Conus*. *J Mar Biol Ass UK* 73: 241-244
- Krüger AM, Hellwig FH, Oberprieler C (2002) Genetic diversity in natural and anthropogenic inland populations of salt-tolerant plants: random amplified polymorphic DNA analyses of *Aster tripolium* L. (Compositae) and *Salicornia ramosissima* Woods (Chenopodiaceae). *Mol Ecol* 11: 1647-1655
- Lebour MV (1931) The larval stages of *Nassarius reticulatus* and *Nassarius incrassatus*. *J Mar Biol Ass UK* 17: 797-818
- Lessells CM, Mateman AC (1998) Sexing birds using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mol Ecol* 7: 187-195
- Lewontin RC, Hubby JL (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 596-609
- Liu LL, Chen SJ, Peng WY, Hung JJ (1997) Organotin concentrations in three intertidal neogastropods from the coastal waters of Taiwan. *Environ Pollut* 98: 113-118
- Lowe A, Harris S, Ashton P (2004) *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*. Blackwell Pub., Malden, MA
- Magnusson M, Granmo Å (2004) Investigation of imposex on the Swedish west coast using *Nassarius reticulatus* as a bioindicator species. Report from Göteborg University and Naturvårdsverket.
- Mailer RJ, May CE (1999) Heterogeneity of random amplified polymorphic DNA sequences in individual seedlings and bulked samples of four cultivars of *Brassica napus*. *Plant Breed* 118: 465-470
- Maldonado San Martín AP, Adamec L, Suda J, Mes THM, Storchova H (2003) Genetic variation within the endangered species *Aldrovanda vesiculosa* (Droseraceae) as revealed by RAPD analysis. *Aquat Bot* 75: 159-172
- Maltagliati F, Domenici P, Franch Fosch C, Cossu P, Casu M, Castelli A (2003) Small-scale morphological and genetic differentiation in the Mediterranean killfish *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae) from a coastal brackish-water pond and an adjacent pool in northern Sardinia. *Oceanol Acta* 26: 111-119

- Mann R, Harding JM, Westcott E (2006) Occurrence of imposex and seasonal patterns of gameteogenesis in the invading veined rapa whelk *Rapana venosa* from Chesapeake Bay, USA. *Mar Ecol Prog Ser* 310: 129-138
- Marshall DJ, Rajkumar A (2003) Imposex in the indigenous *Nassarius kraussianus* (Mollusca: Neogastropoda) from South African harbours. *Mar Pollut Bull* 46: 1150-1155
- Martínez EA, Destombe C, Quillet MC, Valero M (1999) Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers highly linked to sex determination in the red alga *Gracilaria gracilis*. *Mol Ecol* 8: 1533-1538
- Matthiessen P (2003) Historical perspective on endocrine disruption in wildlife. *Pure Appl Chem* 75: 2197-2206
- Matthiessen P, Gibbs PE (1998) Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ Toxicol Chem* 17:37-43
- Matthiessen P, Waldock R, Thain JE, Waite ME, Scrope-Howe S (1995) Changes in periwinkle (*Littorina littorea*) populations following the ban on TBT-based antifoulings on small boats in the United Kingdom. *Ecotoxicol Environ Saf* 30: 180-194
- Maxam AM, Gilbert W (1977) New Method for Sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 560-564
- Meneses I (1996) Assessment of populations of *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta) utilizing RAPDs. *J Appl Phycol* 8: 185-192
- Michel P, Averty B (1999) Contamination of French Coastal Waters by Organotin Compounds-1997 Update. *Mar Pollut Bull* 38: 268-275
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9828-9832
- Minchin A, Minchin D (1997) Dispersal of TBT from a fishing port determined using the dogwhelk *Nucella lapillus* as an indicator. *Environ Technol* 18: 1225-1234
- Minchin D, Stroben E, Oehlmann J, Bauer B, Duggan CB, Keatinge M (1996) Biological indicators used to map organotin contamination in Cork Harbour, Ireland. *Mar Pollut Bull* 32: 188-195
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263-273
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350
- Nebauer SG, del Castillo-Agudo L, Segura J (2000) An assessment of genetic relationship within the genus *Digitalis* based on PCR-generated RAPD markers. *Theor Appl Genet* 100: 1209-1216
- Nias DJ, McKillup SC, Edyvane KS (1993) Imposex in *Lepsiella vinosa* from Southern Australia. *Mar Pollut Bull* 26: 380-384
- Nishikawa J-i (2006) Imposex in marine gastropods may be caused by binding of organotins to retinoid X receptor. *Mar Biol* 149: 117-124
- Nishikawa J, Mamiya S, Kanayama T, Nishikawa T, Shiraishi F, Horiguchi T (2004) Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods. *Environ*

Sci Technol 38: 6271-6276

- Oberdörster E, McClellan-Green P (2000) The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*. *Peptides* 21: 1323-1330
- Oberdörster E, McClellan-Green P (2002) Mechanisms of imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor. *Mar Environ Res* 54: 715-718
- Oberdörster E, McClellan-Green P (2004) The neuropeptide hormone APGWamide is elevated in imposex snails dosed with TBT or collected from the field. *Mar Environ Res* 58: 407-408
- Oberdörster E, Romano J, McClellan-Green P (2005) The neuropeptide APGWamide as a penis morphogenic factor (PMF) in gastropod mollusks. *Integr Comp Biol* 45: 28-32
- Oehlmann J, Di Benedetto P, Tillmann M, Duft M, Oetken M, Schulte-Oehlmann U (2007) Endocrine disruption in prosobranch molluscs: evidence and ecological relevance. *Ecotoxicology* 16: 29-43
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U (2003) Endocrine disruption in invertebrates. *Pure Appl Chem* 75: 2207-2218
- Okoshi J, Mori K, Nomura T (1987) Characteristics of shell chamber formation between the two local races in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 67: 313-320
- Omae I (2003) Organotin antifouling paints and their alternatives. *Appl Organomet Chem* 17: 81-105
- Palacios C, González Candela F (1997) Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae). *Mol Ecol* 6: 1107-1121
- Palumbi SR (1996) Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, p 655
- Palumbi SR (2003) Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecol Appl* 13: S146-S158
- Palumbi SR, Gaines SD, Leslie H, Warner RR (2003) New wave: high-tech tools to help marine reserve research. *Front Ecol Evol* 1: 73-79
- Paran I, Kesseli R, Michelmore R (1991) Identification of restriction fragment length polymorphic and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. *Genome* 34: 1021-1027
- Patwary MU, MacKay RM, van der Meer JP (1993) Revealing genetic markers in *Gelidium vagum* (Rhodophyta) through the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. *J Phycol* 29: 216-222
- Penchaszadeh PE, Averbuj A, Cledón M (2001) Imposex in gastropods from Argentina (South-Western Atlantic). *Mar Pollut Bull* 42: 790-791
- Perrin C, Wing SR, Roy MS (2004) Effects of hydrographic barriers on population genetic structure of the sea star *Coscinasterias muricata* (Echinodermata, Asteroidea) in the New Zealand fiords. *Mol Ecol* 13: 2183-2195
- Perron M, Bousquet J (1997) Natural hybridization between black spruce and red spruce. *Mol Ecol* 6: 725-734
- Pessoa MF, Fernando A, Oliveira JS (2001) Use of imposex (Pseudohermaphroditism) as indicator of the occurrence of organotin compounds in Portuguese coastal waters-Sado and Mira estuaries.

Environ Toxicol 16: 234-241

- Poli G, Salvat B, Streiff W (1971) Aspect particulier de la sexualité chez *Ocenebra erinacea* (Mollusque, Gastéropode, Prosobranchie). *Halictis* 1: 29-30
- Porter JS, Ryland JS, Carvalho GR (2002) Micro- and macrogeographic genetic structure in bryozoans with different larval strategies. *J Exp Mar Biol Ecol* 272: 119-160
- Prouse NJ, Ellis DV (1997) A baseline survey of dogwhelk (*Nucella lapillus*) imposex in eastern Canada (1995) and interpretation in terms of tributyltin (TBT) contamination. *Environ Technol* 18: 1255-1267
- Quintela M, Couceiro L, Ruiz JM, Barreiro R (2006) Discovery of imposex in the gastropod *Cyclope neritea* now invading Galicia (north-west Spain). *J Mar Biol Ass UK* 86: 1171-1173
- Rato M, Sousa A, Quinta R, Langston WJ, Barroso CM (2006) Assessment of inshore/offshore TBT pollution gradients in the NW Portugal continental shelf using *Nassarius reticulatus* as a bioindicator. *Environ Toxicol Chem* 12: 3213-3220
- Rees CM, Brady BA, Fabris GJ (2001) Incidence of imposex in *Thais orbita* from Port Phillip Bay (Victoria, Australia), following 10 years of regulation on use of TBT. *Mar Pollut Bull* 42: 873-878
- Reitsemá TJ, Spickett JT (1999) Imposéx in *Morula granulata* as bioindicator of tributyltin (TBT) contamination in the Dampier Archipelago, Western Australia. *Mar Pollut Bull* 39: 280-284
- Reitsemá TJ, Thompson JAJ, Scholtens P, Spickett JT (2002) Further recovery of northeast Pacific neogastropods from imposex related to tributyltin contamination. *Mar Pollut Bull* 44: 257-261
- Riginos C, Nachman MW (2001) Population subdivision in marine environments: the contributions of biogeography, geographical distance and discontinuous habitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*. *Mol Ecol* 10: 1439-1453
- Ritsemá R, Laane RWP, Donard OFX (1991) Butyltins in marine waters of the Netherlands in 1988 and 1989: concentrations and effects. *Mar Environ Res* 32: 243-260
- Roberts CM, Hawkins JP (1999) Extinction risk in the sea. *Trends Ecol Evol* 14: 241-246
- Roman J, Palumbi SR (2004) A global invader at home: population structure of the green crab, *Carcinus maenas*, in Europe. *Mol Ecol* 13: 2891-2898
- Ronis MJJ, Mason AZ (1996) The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) In Vitro and In Vivo: Effects of tributyltin. *Mar Environ Res* 42: 161-166
- Ruiz JM, Barreiro R, González JJ (2005) Biomonitoring organotin pollution with gastropods and mussels. *Mar Ecol Prog Ser* 287: 169-176
- Ruiz JM, Quintela M, Barreiro R (1998) Ubiquitous imposex and organotin bioaccumulation in gastropods *Nucella lapillus* (L.) from Galicia (NW Spain): A possible effect of nearshore shipping. *Mar Ecol Prog Ser* 164: 237-244
- Russell JR, Hosein F, Johnson E, Waugh R, Powell W (1993) Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. *Mol Ecol* 2: 89-97
- Sale PF, Cowen RK, Danilowicz BS, Jones GP, Kritzer JP, Lindeman KC, Planes S, Polunin NVC, Russ GR, Sadovy YJ, Steneck RS (2005) Critical science gaps impede use of no-take fishery reserves. *Trends Ecol Evol* 20: 74-80
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl*

Acad Sci USA 74: 5463-5467

- Santos MM, Castro LFC, Vieira MN, Micael J, Morabito R, Massanisso P, A. R-HM (2005) New insights into the mechanism of imposex induction in the dogwhelk *Nucella lapillus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 141: 101-109
- Santos MM, Ten Hallers-Tjabbes CC, Santos AM, Vieira N (2002a) Imposex en *Nucella lapillus*, a bioindicator for TBT contamination: re-survey along the Portuguese coast to monitor the effectiveness of EU regulation. *J Sea Res* 48: 217-223
- Santos MM, ten Hallers-Tjabbes CC, Vieira N, Boon JP, Porte C (2002b) Cytochrome P450 differences in normal and imposex-affected female whelk *Buccinum undatum* from the open North Sea. *Mar Environ Res* 54: 661-665
- Santos MM, Vieira N, Reis-Henriques MA, Santos AM, Gomez-Ariza JL, Giraldez I, ten Hallers-Tjabbes CC (2004) Imposex and butyltin contamination off the Oporto Coast (NW Portugal): a possible effect of the discharge of dredged material. *Environment International* 30: 793-798
- Santos MM, Vieira N, Santos AM (2000) Imposex in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L) along the Portuguese coast. *Mar Pollut Bull* 40: 643-646
- Sarradin PM, Lapaquellerie Y, Astruc A, Latouche C, Astruc M (1995) Long term behaviour and degradation kinetics of tributyltin in a marina sediment. *Sci Tot Environ* 170: 59-70
- Schaffelke B, Murphy N, Uthicke S (2002) Using genetic techniques to investigate the sources of the invasive alga *Caulerpa taxifolia* in three new locations in Australia. *Mar Pollut Bull* 44: 204-210
- Schulte-Oehlmann U, Bettin C, Fioroni P, Oehlmann J, Stroben E (1995) *Marisa cornuarietis* (Gastropoda, Prosobranchia): a potential TBT bioindicator for freshwater environments. *Ecotoxicology* 4: 372-384
- Seligman PF, Maguire RJ, Lee RF, Hinga KR, Valkirs AO, Stang PM (1996) Persistence and fate of tributyltin in aquatic ecosystems. In: Champ MA, Seligman PF (eds) *Organotin: Environmental Fate and Effects*. Chapman & Hall, London, p 430-457
- Shi H, Huang CJ, Zhu SX, Yu XJ, Xie WY (2005) Generalized system of imposex and reproductive failure in female gastropods of coastal waters of mainland China. *Mar Ecol Prog Ser* 304: 179-189
- Shim WJ, Kahng SH, Hong SH, Kim NS, Kim SK, Shim JH (2000) Imposex in the rock shell, *Thais clavigera*, as evidence of organotin contamination in the marine environment of Korea. *Mar Environ Res* 49: 435-451
- Short JW, Rice SD, Brodersen CC, Stickle WB (1989) Occurrence of tri-nbutyltin-caused imposex in the North Pacific marine snail *Nucella lima* in Auke Bay, Alaska. *Mar Biol* 102: 291-297
- Silva EP, Russo CAM (2000) Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. *Hydrobiologia* 420: 119-135
- Smith BS (1971) Sexuality in the American mud snail, *Nassarius obsoletus* Say. *Proc Malacol Soc London* 39: 377-378
- Smith BS (1980) The estuarine mud snail, *Nassarius obsoletus*: abnormalities in the reproductive system. *J Molluscan Stud* 46: 247-256
- Smith BS (1981a) Male characteristics on female mud snails caused by antifouling bottom paints. *J Appl Toxicol* 1: 22-25

- Smith BS (1981b) Reproductive anomalies in stenoglossan snails related to pollution from marinas. *J Appl Toxicol* 1: 15-21
- Smith BS (1981c) Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus*= *Ilyanassa obsoleta*. *J Appl Toxicol* 1: 141-144
- Smith PJ (1996) Selective decline in imposex levels in the dogwhelk *Lepsiella scobina* following a ban on the use of TBT antifoulants in New Zealand. *Mar Pollut Bull* 4: 362-365
- Smith PJ, McVeagh M (1991) Widespread organotin pollution in New Zealand coastal waters as indicated by imposex in dogwhelks. *Mar Pollut Bull* 22: 409-413
- Sotka EE, Hempelmann JA, Biermann CH (2005) Genetic evidence of postglacial population expansion in Puget Sound rockfish (*Sebastes emphaeus*). *Mar Biotechnol* 7: 223-230
- Sotka EE, Wares JP, Barth JA, Grosberg RK, Palumbi SR (2004) Strong genetic clines and geographical variation in gene flow in the rocky intertidal barnacle *Balanus glandula*. *Mol Ecol* 13: 2143-2156
- Sousa A, Mendo S, Barroso CM (2005) Imposex and organotin contamination in *Nassarius reticulatus* (L.) along the Portuguese coast. *Appl Organomet Chem* 19: 315-323
- Spence SK, Hawkins SJ, Santos RS (1990) The mollusc *Thais haemastoma* - an exhibitor of 'imposex' and potential biological indicator of tributyltin pollution. *PSZNI Marine Ecology* 11: 147-156
- Spooner N, Gibbs PE, Bryan GW, Goad LJ (1991) The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Mar Environ Res* 32: 37-49
- Stæhr PA, Pedersen MF, Thomsen MS, Wernberg T, Krause-Jensen D (2000) Invasion of *Sargassum muticum* in Limfjorden (Denmark) and its possible impact on the indigenous macroalgal community. *Mar Ecol Prog Ser* 207: 79-88
- Star B, Apte S, Gardner JPA (2003) Genetic structuring among populations of the greenshell mussel *Perna canaliculus* revealed by analysis of randomly amplified polymorphic DNA. *Mar Ecol Prog Ser* 249: 171-182
- Stephenson MD, Smith DR, Goetzl J, Ichikawa G, Martin M (1986) Growth abnormalities in mussels and oysters from areas with high levels of tributyltin in San Diego Bay OCEANS '86, Organotin Symposium. Institute of Electric and Electronics Engineers, New York, p 1246-1251
- Stewart C, de Mora SJ, Jones MRL, Miller MC (1992) Imposex in New Zealand neogastropods. *Mar Pollut Bull* 24: 204-209
- Stroben E, Oehlmann J, Bettin C (1991) TBT-induced imposex and the role of steroids in marine snails Tenth World Meeting of the Organotin Environmental Programme Association, Berlin, p 68-73
- Stroben E, Oehlmann J, Fioroni P (1992a) *Hinia reticulata* and *Nucella lapillus*. Comparison of two gastropod tributyltin bioindicators. *Mar Biol* 114: 289-296
- Stroben E, Oehlmann J, Fioroni P (1992b) The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributyltin pollution. *Mar Biol* 113: 625-636
- Svavarsson J (2000) Imposex in the dogwhelk (*Nucella lapillus*) due to TBT contamination: Improvement at high latitudes. *Mar Pollut Bull* 40: 893-897
- Svavarsson J, Skarphéðinsdóttir H (1995) Imposex in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) in Icelandic waters. *Sarsia* 80: 35-40
- Swennen C, Ruttanadakul N, Ardseungnarn S, Singh HR, Mensink BP, ten Hallers-Tjabbes CC (1997) Im-

- posex in sublittoral and littoral gastropods from the gulf of Thailand and strait of Malacca in relation to shipping. *Environ Technol* 18: 1245-1254
- Tallmark B (1980) Population dynamics of *Nassarius reticulatus* (Gastropoda: Prosobranchia) in Gullmar Fjord, Sweden. *Mar Ecol Prog Ser* 3: 51-62
- Tallmark B, Norrgren G (1976) The influence of parasitic trematodes on the ecology of *Nassarius reticulatus* (L.) in Gullmar Fjord (Sweden). *Zoon* 4: 149-154
- Tan KS (1997) Imposex in three species of *Thais* from Singapore, with additional observations on *T. clavigera* (Küster) from Japan. *Mar Pollut Bull* 34: 577-821
- Tan KS (1999) Imposex in *Thais gradata* and *Chicoreus capucinus* (Mollusca, Neogastropoda, Muricidae) from the Straits of Johor: A case study using penis length, area and weight as measures of imposex severity. *Mar Pollut Bull* 39: 295-303
- ten Hallers-Tjabbes CC, Kemp JF, Boon JP (1994) Imposex in whelks (*Buccinum undatum*) from the Open North Sea: relation to shipping traffic intensities. *Mar Pollut Bull* 28: 311-313
- Tester M, Ellis D (1995) TBT controls and the recovery of whelks from imposex. *Mar Pollut Bull* 30: 90-91
- Thomas MLH (1969) Tests of anti-fouling paints and wood preservatives at Bideford, P.E.I., 1966 and 1967. Report No. 119, Fisheries Research Board of Canada
- Thorpe JP, Solé-Cava AM, Watts PC (2000) Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *Hydrobiologia* 420: 165-184
- Valkirs AO, Davidson B, Kear LL, Fransham RL (1991) Long-term monitoring of tributyltin in San Diego Bay, California. *Mar Environ Res* 32: 151-167
- Vigilino L, Pelletier E, Lee LEJ (2006) Butyltin species in benthic and pelagic organisms of the Saguenay Fjord (Canada) and imposex occurrence in common whelk (*Buccinum undatum*). *Arch Environ Contam Toxicol* 50: 45-59
- Vishwa Kiran Y, Anil AC (1999) Record of imposex in *Cronia konkanensis* (Gastropoda, Muricidae) from Indian waters. *Mar Environ Res* 48: 123-130
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee vdT, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414
- Vucetich LM, Vucetich JA, Joshi CP, Waite TA, Peterson RO (2001) Genetic (RAPD) diversity in *Peromyscus maniculatus* populations in a naturally fragmented landscape. *Mol Ecol* 10: 35-40
- Waite ME, Thain JE, Waldock JM, Cleary JJ, Stebbing ARD, Abel R (1996) Changes in concentrations of organotins in water and sediment in England and Wales following legislation. In: Champ MA, Seligman PF (eds) *Organotin*. Chapman & Hall, London, UK, p 553-580
- Waldock MJ, Thain JE (1983) Shell thickening in *Crassostrea gigas*: organotin antifouling or sediment induced? *Mar Pollut Bull* 14: 411-415
- Wallace DC (1994) Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8739-8746
- Waples RS (1998) Separating the wheat from the chaff: Patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *J Hered* 89: 438-450
- Ward RD, Woodward M, Skibinski DOF (1994) A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology* 44: 213-232

- Wares JP, Cunningham CW (2001) Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution* 55: 2455-2469
- Warnke K, Söller R, Blohm D, Saint-Paul U (2000) Rapid differentiation between *Octopus vulgaris* Cuvier (1797) and *Octopus mimus* Gould (1852), using randomly amplified polymorphic DNA. *J Zool Syst Evol Res* 38: 119-122
- Waters JM, Roy MS (2004) Phylogeography of a high-dispersal New Zealand sea-star: does upwelling block gene-flow? *Mol Ecol* 13: 2797-2806
- Weising K, Nybom H, Wolff K, Meyer W (1994) DNA fingerprinting in plants and fungi, CRC Press, Inc., Boca Raton
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535
- Wilson SP, Ahsanullah M, Thompson GB (1993) Imposex in neogastropods: an indicator of tributyltin contamination in Eastern Australia. *Mar Pollut Bull* 26: 44-48
- Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA, Tingey SV (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol* 218: 704-740
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535
- Wirzinger G, Vogt C, Bachmann J, Hasenbank M, Liers C, Stark C, Ziebart S, Oehlmann J (2007) Imposex of the netted whelk *Nassarius reticulatus* (Prosobranchia) in Brittany along a transect from a point source. *Cah Biol Mar* 48: 85-94
- Wolff K, El-Akkad S, Abbott RJ (1997) Population substructure in *Alkanna orientalis* (Boraginaceae) in the Sinai Desert, in relation to its pollinator behaviour. *Mol Ecol* 6: 365-372
- Zouhair R, Corradini P, Defontaine A, Hallet JN (2000) RAPD markers for genetic differentiation of species within *Polytrichum* (Polytrichaceae, Musci): a preliminary study. *Taxon* 49: 217-229

O B J E C T I V E S



La presente memoria está estructurada en 5 estudios independientes cuyos objetivos se detallan a continuación:

- En el Capítulo 1 **"Imposex y bioacumulación de organoestánicos en poblaciones de *Nassarius reticulatus* (L.) de Galicia (NO de la Península Ibérica): situación actual y tendencia temporal (2000-2005)"**, el grado de contaminación por tributilo de estaño (TBT) es evaluado en 46 localidades de la costa gallega empleando *Nassarius reticulatus* como organismo bioindicador. Con los datos obtenidos se pretende: (i) ampliar la información relativa al imposex en esta especie y su utilidad en estudios de biomonitorización; (ii) evaluar la situación actual de la costa gallega en lo relativo a este tipo de contaminación; y (iii) comparar los datos obtenidos con aquellos derivados de un estudio previo con el objetivo de determinar la evolución temporal de los niveles del contaminante en el área geográfica estudiada y establecer la efectividad de la legislación vigente.
- En el Capítulo 2 **"Estructura genética de poblaciones del prosobranquio *Nassarius reticulatus* (L.) en la costa de Galicia (NO de la Península Ibérica) revelada con marcadores RAPD"**, la conectividad de poblaciones de organismos con alto potencial dispersivo a lo largo del litoral atlántico gallego es investigada utilizando marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) y *Nassarius reticulatus* como modelo de estudio. Con los datos obtenidos se pretende: (i) evaluar la conectividad demográfica de las poblaciones en la región; e (ii) investigar si las rías limitan de algún modo el flujo genético entre las poblaciones de su interior y las situadas en la costa abierta adyacente.
- En el Capítulo 3 **"Aislamiento genético por distancia entre poblaciones de *Nassarius reticulatus* (L.) a lo largo de la costa atlántica europea"**, la conectividad de poblaciones de organismos con alto potencial dispersivo a lo largo de las costas atlánticas del sur de Europa es investi-

gada utilizando secuencias mitocondriales del gen Citocromo c Oxidasa Subunidad I (COI) y, nuevamente, *Nassarius reticulatus* como modelo de estudio. Con los datos obtenidos se pretende: (i) evaluar la conectividad demográfica de las poblaciones a lo largo de una escala espacial relativamente amplia (~1700 km); y (ii) establecer qué procesos (históricos y contemporáneos) determinan la estructura genética de las poblaciones en el área geográfica estudiada.

- En el Capítulo 4 **"Presencia de *Cyclope neritea* (L.) (Gastropoda, Prosobranchia) en el NO de la Península Ibérica: origen y grado de imposex de las poblaciones"**, las poblaciones gallegas de un gasterópodo alóctono (*Cyclope neritea*) son estudiadas desde un punto de vista interdisciplinar. Con los datos obtenidos se pretende: (i) investigar si las hembras de esta especie desarrollan imposex; (ii) caso de registrarse dicha anomalía, proporcionar una descripción detallada de sus características y evaluar el grado de afectación de las poblaciones estudiadas; y (iii) determinar, empleando secuencias mitocondriales del gen COI, si dichas poblaciones tienen su origen en una introducción accidental mediada por el hombre o son el resultado de una expansión natural de su rango geográfico a partir de enclaves naturales próximos. Además, se discutirá la posible influencia que el descenso de la contaminación por TBT puede presentar sobre la expansión del rango geográfico de ésta y otras especies de prosobranquios.
- Finalmente, en el Capítulo 5 **"DNA barcoding en dos especies morfológicamente similares del género *Nassarius* Duméril: *Nassarius reticulatus* (L.) y *Nassarius nitidus* (Jeffreys)"**, el grado de divergencia de dos especies del género *Nassarius* objeto de un considerable debate taxonómico (*Nassarius reticulatus* y *Nassarius nitidus*) es investigado utilizando secuencias mitocondriales del gen COI de distintas poblaciones europeas. Con los datos obtenidos se pretende: (i) mostrar la utilidad de dichas secuencias en la distinción de ambas especies (*DNA barcoding*); y (ii) proporcionar un método sencillo y económico para la identificación rutinaria de las mismas (mapa de restricción). Además, se presentarán y discutirán datos preliminares sobre la presencia y distribución de ambos organismos a lo largo de las costas atlánticas y mediterráneas de Europa.

C 1 A P I T U L O



CAPÍTULO 1: IMPOSEX Y BIOACUMULACIÓN DE ORGANOESTÁNNICOS EN POBLACIONES DE *NASSARIUS RETICULATUS* (L.) DE GALICIA (NO PENÍNSULA IBÉRICA): SITUACIÓN ACTUAL Y EVOLUCIÓN TEMPORAL (2000-2005)

1. INTRODUCCIÓN

2. OBJETIVOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ESCALA GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO Y RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

3.2. EVALUACIÓN DEL IMPOSEX

3.3. ANÁLISIS DE ORGANOESTÁNNICOS

4. RESULTADOS

4.1. INCIDENCIA DEL PARASITISMO Y PROPORCIÓN DE SEXOS

4.2. NIVELES DE IMPOSEX

4.3. NIVELES DE BUTILESTÁNNICOS (BTs) EN TEJIDOS

4.4. RELACIÓN ENTRE LOS ÍNDICES BIOLÓGICOS Y LA CONTAMINACIÓN

4.5. IMPOSEX Y TRIBUTO DE ESTAÑO (TBT) EN LA COSTA GALLEGA: VARIACIÓN ESPACIAL

4.6. IMPOSEX Y BUTILESTÁNNICOS (BTs) EN LA COSTA GALLEGA: VARIACIÓN TEMPORAL

4.6.1 IMPOSEX

4.6.2 BUTILESTÁNNICOS (BTs)

4.6.3 RELACIÓN IMPOSEX – TRIBUTO DE ESTAÑO (TBT)

5. DISCUSIÓN

5.1. UTILIDAD BIOINDICADORA DE LA ESPECIE

5.2. IMPOSEX EN *NASSARIUS RETICULATUS* *versus* CONTAMINACIÓN POR TBT

5.3. NIVELES ACTUALES DE CONTAMINACIÓN E IMPOSEX EN LA COSTA GALLEGA

5.4. TENDENCIA TEMPORAL

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INTRODUCCIÓN

Se denomina imposex al fenómeno por el que las hembras de gasterópodos dioicos desarrollan órganos sexuales masculinos, principalmente un pene y un vaso deferente, junto con aquéllos característicos de su sexo (Smith 1971). Esta anomalía se detecta por primera vez a finales de la década de 1960 en poblaciones de *Nucella lapillus* del suroeste de Inglaterra (Blaber 1970) pero, en menos de un año, se producen registros similares en otras especies procedentes de lugares muy distantes entre sí: *Ocenebra erinacea* en Francia (Poli et al. 1971), *Thais emarginata* en la costa oeste de Estados Unidos (Houston 1971) e *Ilyanassa obsoleta* en la costa este de Estados Unidos (Smith 1971). A principios de la década de 1980 se observa que la frecuencia del imposex en poblaciones de *I. obsoleta* se incrementa con la proximidad a áreas de tráfico marítimo intenso (Smith 1981b); poco tiempo después, dicha masculinización es vinculada con el tributilo de estaño (TBT), un compuesto organoestánico ampliamente utilizado en pinturas antiincrustantes desde la década de 1970 (Smith 1981a, 1981c). Sin embargo, estas investigaciones no reciben mayor atención puesto que el desarrollo de pene y conducto deferente en las hembras de dicha especie no parece perturbar de modo alguno el normal funcionamiento de los individuos afectados.

Años después, estos trabajos se retoman en Inglaterra, donde se observa que el imposex reduce severamente la capacidad reproductiva de las poblaciones de *Nucella lapillus* (Gibbs & Bryan 1986). Diversas experiencias también establecen en esta especie una inequívoca relación entre imposex y contaminación por TBT (Bryan et al. 1986, Bryan et al. 1987). Además, se demuestra que este fenómeno se manifiesta de un modo dosis-dependiente y que su desarrollo se inicia para concentraciones ambientales de TBT extremadamente bajas (<0.5 ng Sn/l). Tales características llevan a Gibbs et al. (1987) a proponer el empleo del imposex en dicha especie en estudios de biomonitorización.

Así, en los años inmediatamente posteriores, la existencia de poblaciones afectadas se registra en distintas áreas geográficas (Escocia: Bailey & Davies 1988, Bailey & Davies 1989; España y Portugal: Peña et al. 1988).

Al mismo tiempo, esta anomalía comienza a estudiarse también en otros gasterópodos con la finalidad de determinar su extensión geográfica y taxonómica. En 1991 el fenómeno es registrado ya en 69 especies distintas (Fioroni et al. 1991): en todas ellas se observa el mismo esquema general de evolución del imposex, si bien se detectan diferencias en lo relativo a la sensibilidad (*i.e.* concentración umbral que desencadena la respuesta) y consecuencias finales (*i.e.* esterilidad funcional). El imposex en alguna de estas especies es utilizado igualmente como biomarcador de exposición de la contaminación por TBT, particularmente en aquellas regiones fuera del rango de distribución de *Nucella lapillus*: *e.g.* *Ilyanassa obsoleta* en Estados Unidos (Bryan et al. 1989), *Nucella lima* en Alaska (Short et al. 1989), *Thais haemastoma* en las Azores (Spence et al. 1990), *Lepsiella scobina* en Nueva Zelanda (Smith & McVeagh 1991), *Thais clavigera* en Japón (Horiguchi et al. 1994) o *Hexaplex trunculus* en la costa mediterránea (Axiak et al. 1995).

Este fenómeno no es sin embargo el único efecto adverso ocasionado por el TBT sobre organismos no diana. La liberación de este compuesto al medio marino también se relaciona con el declive de cultivos de bivalvos en distintas áreas costeras (*e.g.* Francia: Alzieu et al. 1982, Inglaterra: Waldock & Thain 1983, Estados Unidos: Stephenson et al. 1986, Japón: Okoshi et al. 1987, o Australia: Batley et al. 1989) y otros efectos tóxicos son demostrados en distintos grupos taxonómicos, desde organismos fitoplanctónicos (Beaumont & Newman 1986) hasta mamíferos marinos (Tanabe et al. 1998). A finales de la década de 1980, el TBT es considerado ya uno de los compuestos más tóxicos jamás introducido de manera deliberada en el medio marino (Goldberg 1986). Estos hechos provocan que distintos países regulen el empleo de pinturas antiincrustantes basadas en este biocida, prohibiendo su uso en embarcaciones con eslora inferior a 25 metros (Champ 2000): *e.g.* Francia (1982), Reino Unido (1987), Estados Unidos (1988) o Canadá, Nueva Zelanda, Australia y la Unión Europea (1989); en España, la anterior directiva comunitaria es adoptada en el año 1990.

Tras la implementación de las anteriores medidas legislativas, los estudios relativos al imposex siguen llevándose a cabo con la finalidad de reevaluar dicha contaminación y efectos biológicos asociados (e.g. Bryan et al. 1993, Matthiessen et al. 1994, Evans et al. 1996, Smith 1996, Harding et al. 1997, Svavarsson 2000, Rees et al. 2001, Barroso & Moreira 2002, Birchenough et al. 2002a, Birchenough et al. 2002b, Reitsema et al. 2002, Huet et al. 2004, Sousa et al. 2005, Wirzinger et al. 2007). Estos estudios muestran que la contaminación ha descendido en muchos lugares, si bien sus niveles continúan siendo preocupantes. Por ello, distintos países proclaman la necesidad de que este compuesto sea totalmente prohibido. El 5 de Octubre de 2001, la Organización Marítima Internacional (IMO) ha adoptado el "*Convenio Internacional sobre el Control de Sistemas Antilincrustantes Nocivos en Buques*". Este acuerdo prohíbe reapplicar pinturas con TBT en embarcaciones de todo tipo a partir del 1 de enero de 2003, con el objetivo de que en enero de 2008 no quede ni un solo barco pintado con este compuesto (ver www.imo.org). Aunque su ratificación por el número requerido de países (i.e. veinticinco estados cuyas flotas mercantes combinadas representen no menos del 25% del tonelaje bruto de la marina mercante mundial) ha ocurrido tan sólo recientemente (el 17 de septiembre de 2007), la Comisión Europea se ha adelantado a ella y ha resuelto la prohibición total para sus países miembros desde el 1 de enero de 2003 (Directiva 2002/62/CE).

2. OBJETIVOS

La costa de Galicia, en el noroeste de la Península Ibérica, soporta un intenso tráfico marítimo. Las principales actividades económicas relacionadas con el mar son la pesca y la miticultura. La flota pesquera con puerto base en Galicia (unas 5300 embarcaciones de pesca más un millar de embarcaciones auxiliares) es la más importante de todas las regiones europeas y también la mayor de España; de hecho, Galicia posee el 40% de los barcos españoles (ver www.pescadegalicia.com). Por otra parte, la producción anual media de mejillón se ha mantenido en los últimos años próxima a las 300000 toneladas, valores que sitúan a Galicia en el segundo puesto del *ranking* mundial, tan sólo superado por China (Franco 2006). A las anteriores actividades hay que añadir la existencia de tres grandes puertos comerciales en el interior de las Rías de Ferrol, A Coruña y Vigo. Finalmente, cabe destacar también el importante auge que la flota de recreo ha experimentado en los últimos años: en la actualidad 28 puertos deportivos con una capacidad total próxima a las 9000 plazas (ver www.puertosdeportivosdegalicia.es) frente a los 17 puertos y apenas 3000 amarres existentes en el año 1998 (Besteiro 2004).

A mediados de la década de 1990 se observó que el imposex afectaba de modo severo a las poblaciones gallegas de *Nucella lapillus*, indicando una contaminación por TBT ubicua y elevada en la región (Ruiz et al. 1998). Sin embargo, la ausencia de este gasterópodo en algunos enclaves sospechosos de una contaminación importante motivó la búsqueda de una especie bioindicadora alternativa; a la vista de los estudios de Stroben et al. (1992b) y Bryan et al. (1993), se pensó que *Nassarius reticulatus* representaba un candidato adecuado con tal fin. Así, a finales de la década de 1990, Barreiro et al. (2001) establecen que el imposex en *N. reticulatus* también constituye una poderosa herramienta de biomonitorización del TBT en Galicia. En el año 2000, el imposex es evaluado en 26 pobla-

ciones de esta especie distribuidas a lo largo de las siete principales rías de la región; este estudio muestra que la contaminación continúa siendo importante en todas ellas pese a que han transcurrido diez años desde que España adoptara medidas parciales relativas al uso de pinturas antiincrustantes con TBT (Ruiz et al. 2005).

En el presente trabajo se evalúan nuevamente los niveles de imposex de las poblaciones de *Nassarius reticulatus* estudiadas en el año 2000, así como sus concentraciones tisulares de organoestánicos. Además, dicha campaña es ampliada hasta un total de 46 localidades que cubren todo el litoral gallego. Con los datos obtenidos se pretende:

1. Ampliar la información relativa al imposex en esta especie, así como su utilidad en estudios de biomonitorización.
2. Evaluar la situación actual de la costa gallega en lo relativo a este tipo de contaminación.
3. Comparar los datos obtenidos con aquéllos derivados de la campaña realizada en el año 2000, a fin de establecer una tendencia temporal y determinar la efectividad de la legislación vigente.

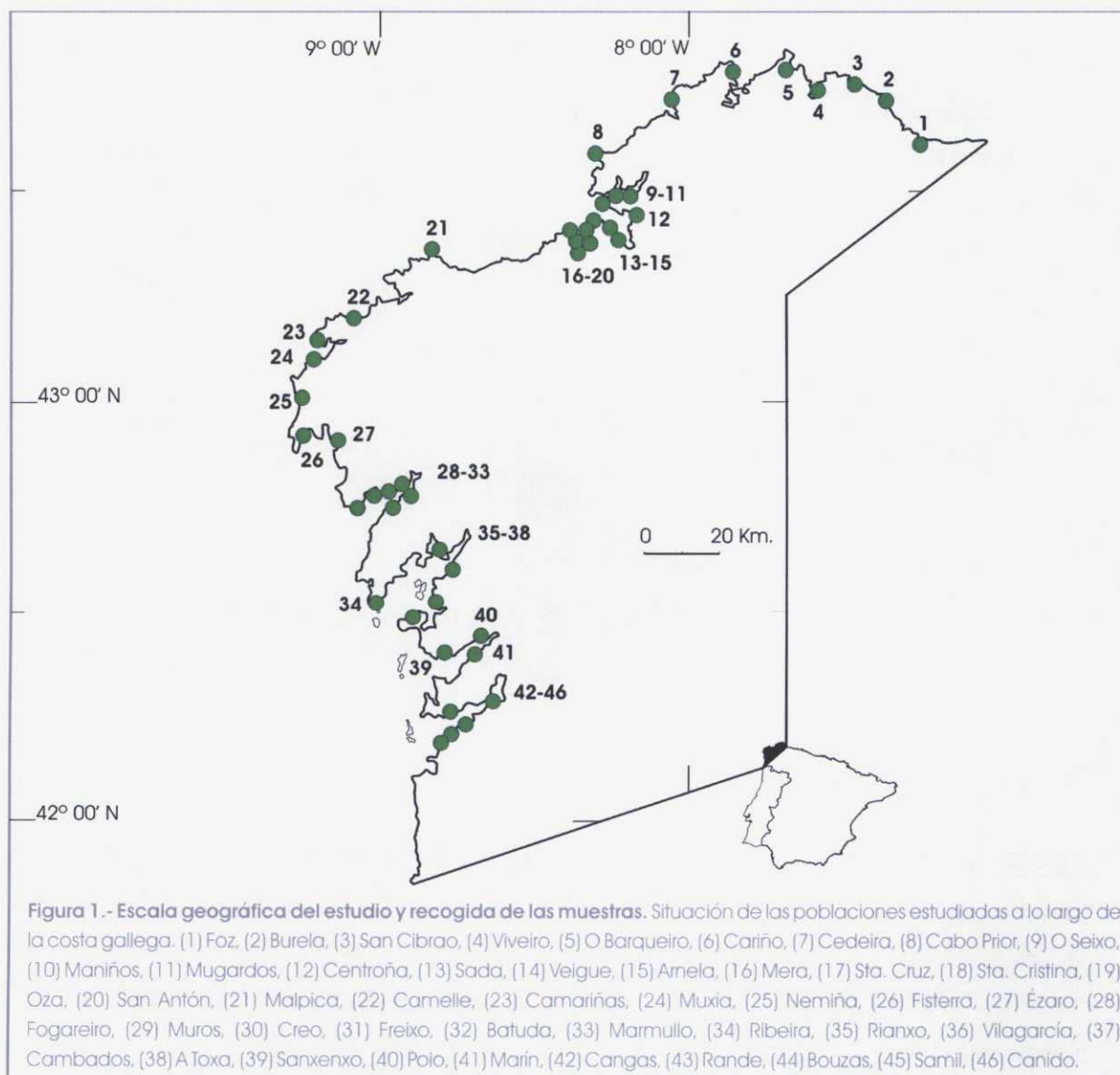
3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- ESCALA GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO Y RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

Individuos adultos de *Nassarius reticulatus* fueron recogidos durante los meses de Febrero–Abril de 2005 en 46 localidades (Tabla 1, Fig.1). La selección de dichas localidades se llevó a cabo atendiendo a dos criterios principalmente: (i) se procuró que las muestras se distribuyesen a lo largo de todo el litoral gallego, incluyendo poblaciones con distinta exposición potencial a este tipo de contaminación; y (ii) siempre que fue posible, se tomaron muestras en aquellas localidades para las cuáles se disponía de datos previos (Ruiz et al. 2005).

La escala temporal del estudio tampoco fue aleatoria: *Nassarius reticulatus* presenta un ciclo reproductivo con un patrón estacional bien definido, y se ha observado que la longitud del pene de los machos puede exhibir cierta variación a lo largo del mismo (Stroben et al. 1992b); en consecuencia, su empleo con la finalidad de comparar el imposex de distintas poblaciones resulta únicamente adecuado cuando los individuos estudiados se encuentran en el mismo estado reproductivo (Barroso & Moreira 1998). Así pues, se decidió concentrar la recogida de las muestras durante el periodo del año en el cuál la especie presenta actividad sexual. Además, el estudio de los individuos en dicho periodo facilitó la identificación de ambos sexos y permitió un examen más exhaustivo de las consecuencias del imposex (e.g. influencia en la formación de cápsulas).

Un número superior a 30 individuos adultos se recogió con la ayuda de un cebo y durante la bajamar en cada una de las localidades. La identificación *a priori* de ejemplares adultos se realizó en base al tamaño del animal, la presencia de dientes en la cara interna de la apertura de la concha y el grosor del labio de dicha apertura.



3.2.- EVALUACIÓN DEL IMPOSEX

Antes de proceder con su disección y estudio, los animales se depuraron en agua de mar (filtrada a $2\ \mu\text{m}$, salinidad 35‰, $T^\circ 15 \pm 1\ ^\circ\text{C}$) durante un mínimo de 2 días con la finalidad de eliminar partículas adheridas de sedimento. Transcurrido dicho periodo, se narcotizaron al menos 30 individuos en cada localidad (utilizando una solución de cloruro de magnesio al 7% en agua destilada) y se examinaron como se detalla a continuación:

1. La longitud de la concha y su apertura fueron medidas con un calibre digital aproximando hasta las centésimas de milímetro (Fig.2).

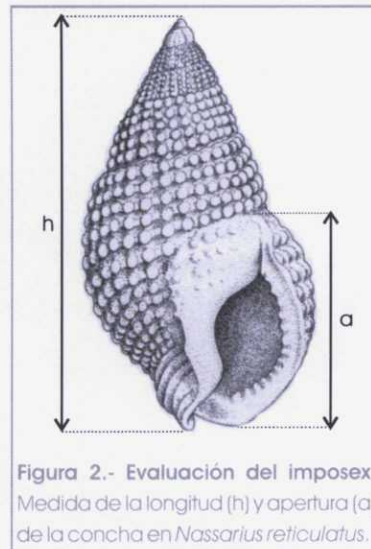


Figura 2.- Evaluación del imposex.
Medida de la longitud (h) y apertura (a)
de la concha en *Nassarius reticulatus*.

2. A continuación, se rompió la concha con la ayuda de un torno y el animal se extrajo cuidadosamente de su interior.
3. Se determinó el sexo del individuo. Puesto que la presencia de pene, a causa del imposex, no constituye un rasgo exclusivo de los machos, la identificación de ambos sexos se llevó a cabo atendiendo a la presencia/ausencia de las glándulas paleales femeninas (i.e. glándula del albumen, glándula de ingestión del esperma y glándula de la cápsula) y, en último término, atendiendo a la presencia/ausencia de papila genital femenina.

4. La longitud del pene fue medida en los ejemplares de ambos sexos utilizando un calibre digital y aproximando hasta las centésimas de milímetro. Dicha medida fue efectuada bajo el estereomicroscopio, abarcando todo el órgano: desde su extremo hasta su punto de unión con la pared del cuerpo.
5. El aparato genital de las hembras fue estudiado cuidadosamente tras rasgar longitudinalmente el techo de la cavidad paleal con el objetivo de: (i) determinar el estadio de la Secuencia del Vaso Deferente (estadio VDS) y (ii) observar la posible existencia de anomalías en la formación de las cápsulas. Los estadios VDS se definieron de acuerdo con el esquema propuesto por Barreiro et al. (2001) para esta especie:
 - Estadio 0. Hembra normal no afectada.
 - Estadio 1. Individuos con pene un rudimentario o una pequeña sección del vaso deferente distal.
 - Estadio 2. Individuos con pene y vaso deferente de longitud no mayor que la mitad de la distancia entre la base del pene y la vulva.
 - Estadio 3. Individuos con pene y vaso deferente cuya longitud sobrepasa la mitad de la distancia entre la base del pene y la vulva.
 - Estadio 4. Individuos con pene y vaso deferente desde la base del pene hasta la vulva.
 - Estadios 4⁺ y 4p. Individuos con pene y vaso deferente que sobrepasa la vulva hacia el canal ventral de la glándula de la cápsula (4⁺) o sigue paralelo al oviducto hasta alcanzar la zona posterior de la cavidad paleal (4p).
6. Además, la porción gonadal del oviducto fue igualmente estudiada siguiendo a Barreiro et al. (2001) con la finalidad de establecer el Grado de Convolución del Oviducto (estadio OS): oviductos rectos, suavemente convolucionados y fuertemente convolucionados fueron puntuados como 0, 1 y 2 respectivamente.

7. Finalmente, los individuos se agruparon atendiendo a su sexo y, tras ser desprovistos de sus respectivos opérculos, se almacenaron en viales de vidrio a -20 °C hasta el momento de analizar su contenido en organoestánicos.

Todos aquellos individuos que tras su disección mostraron síntomas de parasitismo fueron descartados. Los niveles de imposex en cada una de las poblaciones se estimaron utilizando los índices que se detallan a continuación:

- Índice de la Longitud Relativa del Pene (RPLI). Representa la longitud media del pene de las hembras de una población como porcentaje de la de los machos; se calcula a partir de la fórmula $RPLI = (\text{longitud media del pene de las hembras} / \text{longitud media del pene de los machos}) \times 100$.
- Índice de la Secuencia del Vaso Deferente (VDSI). Calcula el valor medio de los estadios VDS de las hembras de una población. Puesto que a los estadios 4+ y 4p se les asignó el valor numérico de 4.5 (Barreiro et al. 2001), este índice muestra valores comprendidos entre 0 y 4.5.
- Índice del Grado de Convolución del Oviducto (AOS). Calcula el valor medio de los estadios OS de las hembras de una población; su valor varía de este modo entre 0 y 2.

Además, para cada localidad estudiada se calculó también el porcentaje de hembras afectadas y el porcentaje de hembras con cápsulas abortadas en su interior.

3.3.- ANÁLISIS DE ORGANOESTÁNNICOS

Las concentraciones medias de organoestánicos –trifenilo de estaño (TPhT), tributilo de estaño (TBT), dibutilo de estaño (DBT) y monobutilo de estaño (MBT)– se cuantificaron en los tejidos de las hembras de 27 localidades. De nuevo, la selección de dichas localidades se llevó a cabo atendiendo a los dos criterios anteriormente expuestos (localidades con distinta exposición potencial a este tipo de contaminación y para las cuáles se disponía de datos previos de concentraciones de organoestánicos en tejidos). Los análisis se realizaron “a ciegas” en el *Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement* (LCABIE, UMR 5034 CNRS-Université de Pau et des Pays de l’Adour, Pau,

Francia), un laboratorio que participa de modo rutinario en la producción de material de referencia de organoestánicos (CRM, *Certified Reference Material*) para la Oficina de Referencias Certificadas de la Unión Europea (BCR, Bureau of Community References). Brevemente, el protocolo seguido fue el detallado a continuación (Szpunar et al. 1996):

1. Tras descongelar y homogenizar las muestras, se tomaron 3 alícuotas de 0.3 g; dos de ellas se emplearon como réplicas en el análisis de organoestánicos mientras que la tercera fue utilizada para la determinación del peso seco.
2. Dichas alícuotas se digirieron en un horno microondas con 5 ml de hidróxido de tetrametilammonio al 25%.
3. Posteriormente, se llevó a cabo una dilución con 15 ml de agua y se ajustó el pH a 5.0 añadiendo ácido acético concentrado y acetato de sodio 1M.
4. A continuación, las especies organoestánicas se etilaron utilizando 1 ml de una solución 1% (peso/volumen) de tetraetilborato de sodio.
5. Finalmente, dichas especies se extrajeron con 1 ml de isooctano y se analizaron en un sistema de Cromatografía de Gases con Detección de Emisión Atómica (GC-AED) empleando tripropilestaño como estándar interno.

Para la validación del anterior protocolo se utilizaron dos materiales de referencia: (i) el tejido de ostra BCR CRM 710 (anteriormente T38) y (ii) el sedimento PACS-2 del *National Research Council* de Canadá. En el momento de los análisis, el primero de ellos se encontraba en proceso de certificación de las concentraciones (mg/Kg PS) de los cationes TBT (0.144 ± 0.049), DBT (0.072 ± 0.041) y MBT (0.101 ± 0.054); se recuperaron concentraciones de 0.180, 0.085 y 0.122 mg/Kg PS respectivamente. Por su parte, el PACS-2 sólo certifica las concentraciones (mg/Kg PS) de dos cationes (0.98 ± 0.13 de TBT y 1.09 ± 0.15 de DBT), siendo las del tercero (0.3 de MBT) de mera referencia; así, el protocolo utilizado cuantificó 0.83, 1.088 y 0.19 mg/Kg PS, respectivamente.

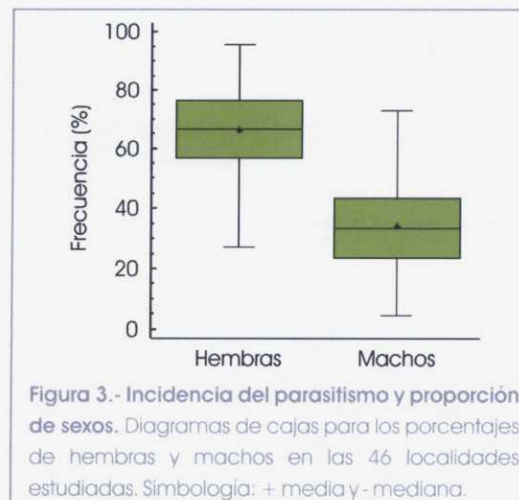
La concentración de compuestos organoestánicos obtenida para cada muestra es la media de dos réplicas inyectadas en el detector; el coeficiente de variación (o RSD) no rebasó nunca el

10%. Por otra parte, los límites de cuantificación (ng Sn/g PS ó ppb Sn PS) del actual protocolo analítico para nuestra serie de muestras fueron de 1.5 para el TBT y el DBT, y 2 para el MBT. En adelante, las concentraciones detectadas se expresan como ng Sn/g PS de tejido de *Nassarius reticulatus*.

4. RESULTADOS

4.1. INCIDENCIA DEL PARASITISMO Y PROPORCIÓN DE SEXOS

Se examinaron un total de 1609 individuos. De las 46 poblaciones estudiadas, casi la mitad (*i.e.* 21) presentó algún ejemplar mostrando síntomas de parasitismo por trematodos, si bien su incidencia varió enormemente entre las distintas poblaciones (desde el 3.2% en Mugaridos o Cariño hasta el 51.2% en Bouzas). En conjunto, dichos ejemplares parasitados representaron aproximadamente un 10% de la muestra total y fueron excluidos del estudio (Tabla 1). El porcentaje de hembras fue superior al de machos en la mayoría de las localidades, como es habitualmente el caso en poblaciones de moluscos gonocorísticos (Feare 1970). De este modo, en la mitad de las poblaciones la proporción de hembras osciló entre el 57% y el 77%, mientras que dicho intervalo para el caso de los machos fue del 25–45%. En conjunto, la proporción media de hembras en las 46 localidades ascendió al 66% y la de machos se situó en torno al 34% (Fig.3).



Localidad	Tipo	Latitud	Longitud	n	n _p	F	M
COSTA NORTE							
1. Foz	FR	43°34'46"	07°15'30"	39	20	6	13
2. Burela	FR	43°39'13"	07°21'06"	51	25	9	17
3. San Cibrao	FR	43°41'45"	07°26'21"	25	1	14	10
4. Viveiro	SPI	43°40'56"	07°35'47"	30	-	16	14
5. O Barqueiro	SPI	43°44'15"	07°42'03"	41	3	25	13
6. Cariño	FR	43°44'38"	07°52'00"	31	1	17	13
7. Cedeira	FR	43°38'56"	08°03'13"	40	5	25	10
8. Cabo Prior	FR	43°33'25"	08°16'27"	30	-	22	8
RÍA DE FERROL							
9. O Seixo	PI	43°27'20"	08°13'03"	31	1	19	11
10. Maniños	PI	43°27'47"	08°11'52"	30	-	20	10
11. Mugardos	PI	43°27'49"	08°16'15"	31	1	17	13
RÍA DE BETANZOS							
12. Centroña	SPI	43°24'38"	08°11'38"	30	-	22	8
13. Sada	SPI	43°21'39"	08°14'54"	39	6	9	24
14. Veigue	SPI	43°23'03"	08°17'14"	30	-	15	15
15. Arnela	SPI	43°22'33"	08°15'44"	43	-	37	6
RÍA DA CORUÑA							
16. Mera	PI	43°22'50"	08°21'02"	45	2	30	13
17. Sta. Cruz	PI	43°21'00"	08°20'50"	37	7	14	16
18. Sta. Cristina	PI	43°20'29"	08°22'25"	38	7	21	10
19. Oza	PI	43°20'33"	08°23'10"	49	19	14	16
20. San Antón	PI	43°21'59"	08°23'16"	30	-	20	10
COSTA ESTE							
21. Malpica	FR	43°19'28"	08°48'42"	41	2	32	7
22. Camelle	FR	43°10'49"	09°05'25"	32	15	13	4
23. Camariñas	FR	43°07'53"	09°11'56"	45	-	43	2
24. Muxía	FR	43°06'02"	09°12'35"	50	2	41	7
25. Nemiña	FR	43°00'39"	09°16'06"	41	-	32	9
26. Fisterra	FR	42°55'32"	09°14'57"	35	5	15	15
27. Ézaro	FR	42°54'35"	09°07'55"	30	-	17	13
RÍA DE MUROS							
28. Fogareiro	SPI	42°45'24"	09°04'35"	30	-	23	7
29. Muros	SPI	42°46'29"	09°13'16"	38	-	32	6
30. Creo	SPI	42°46'59"	08°58'55"	30	-	25	5
31. Freixo	SPI	42°46'59"	08°58'55"	30	-	22	8
32. Batuda	SPI	42°46'23"	08°56'25"	30	-	28	2
33. Marmullo	SPI	42°44'44"	08°57'38"	30	-	24	6

(continúa en la página 83)

Localidad	Tipo	Latitud	Longitud	n	n _p	F	M
RÍA DE AROUSA							
34. Ribeira	PI	42°33'08"	08°59'10"	30	-	25	5
35. Rianxo	PI	42°37'42"	08°50'24"	30	-	19	11
36. Vilagarcía	PI	42°35'41"	08°47'02"	30	-	22	8
37. Cambados	PI	42°30'53"	08°49'01"	32	2	20	10
38. A Toxa	PI	42°29'00"	08°50'42"	30	-	22	8
RÍA DE PONTEVEDRA							
39. Sanxenxo	PI	42°23'51"	08°48'57"	30	-	20	10
40. Poio	PI	42°25'15"	08°40'44"	30	-	19	11
41. Marín	PI	42°23'14"	08°43'13"	30	-	20	10
RÍA DE VIGO							
42. Cangas	PI	42°15'27"	08°45'53"	44	-	32	12
43. Rande	PI	42°16'54"	08°39'47"	30	-	14	16
44. Bouzas	PI	42°13'25"	08°45'34"	43	22	10	11
45. Samil	PI	42°12'12"	08°47'01"	32	1	21	10
46. Canido	PI	42°11'45"	08°47'50"	37	7	18	12
Máximo				51	25	43	24
Mínimo				25	0	6	2
Media				35	3	21	10
Desviación típica				6.6	6.4	8.0	4.2

Tabla 1.- Incidencia del parasitismo y proporción de sexos. Nombre de las localidades estudiadas; tipo de localidad atendiendo a la presencia de puertos importantes (FR: fuera de ría, SPI: dentro de ría sin puertos importantes, PI: dentro de ría con puertos importantes); coordenadas geográficas (latitud N y longitud O); y número total de individuos examinados (n), individuos parasitados (n_p), hembras (F) y machos (M).

4.2. NIVELES DE IMPOSEX

Los valores registrados en cada población para el Índice de la Secuencia del Vaso Deferente (VDSI), el Índice de la Longitud Relativa del Pene (RPLI) y el Índice del Grado de Convolución del Oviducto (AOS) se recogen en la Tabla 2 y se representan gráficamente en la Figura 4. A partir de dichos valores es posible concluir que todas las localidades muestreadas en 2005, a excepción de Malpica, estaban afectadas por imposex en mayor o menor medida.

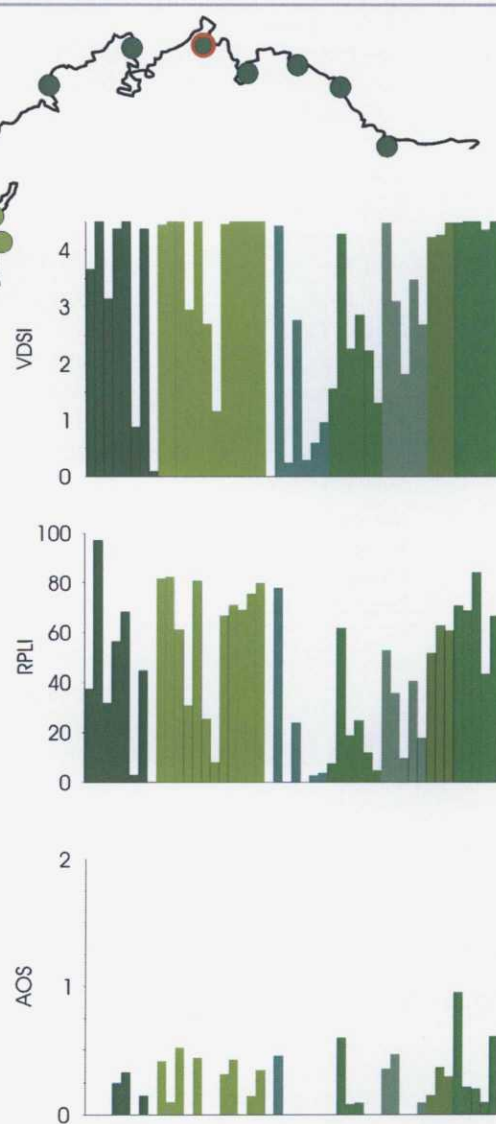
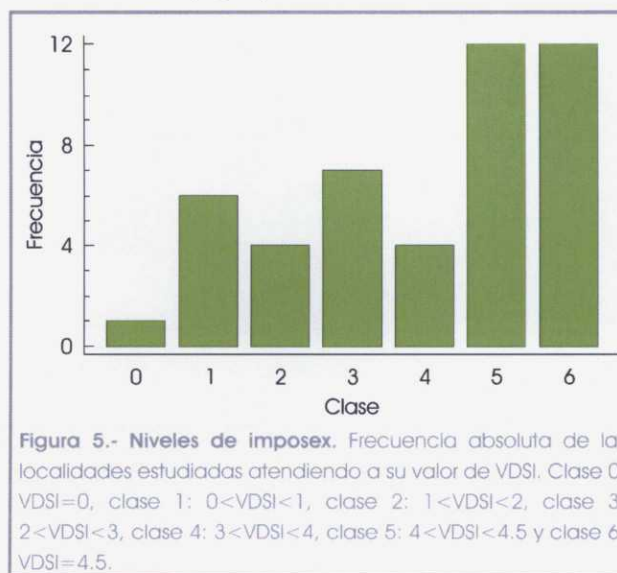


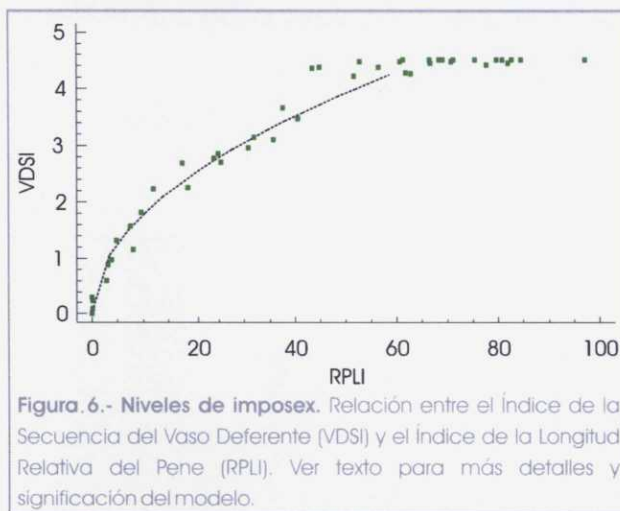
Figura 4.- Niveles de imposex. Diagramas de frecuencias mostrando los valores de los tres de imposex en las localidades estudiadas. El color rojo indica aquellas poblaciones donde fueron encontradas hembras con cápsulas abortadas. Las poblaciones se encuentran ordenadas en dirección NO-SE.

El VDSI tomó valores en toda la amplitud de su rango: desde poblaciones sin hembras afectadas (VDSI=0) hasta otras donde todas presentaban su máxima expresión (VDSI=4.5). Sin embargo, se halló un claro predominio de localidades con valores situados en el extremo superior de la escala: sólo una población presentó un VDSI=0 (Malpica) pero en una docena se registró el máximo valor posible; es más, sólo 7 poblaciones mostraron valores del índice comprendidos entre 0 y 1, pero más de la mitad se situaron en el intervalo 4-4.5 (Fig. 5).



En cuanto al RPLI, únicamente en 2 localidades de las 46 contempladas en el estudio la totalidad de las hembras careció de pene (i.e. RPLI=0%, Malpica y Nemiña), si bien en otras dos los valores RPLI registrados fueron próximos a 0: Cabo Prior (0.1%) y Camariñas (0.2%). En las 42 poblaciones restantes el valor de dicho índice osciló entre el 3% (Fisterra) y el 97% (Burela), siendo habituales en las localidades situadas en el interior de las rías de Ferrol, A Coruña y Vigo valores superiores al 60%. Los valores obtenidos para el RPLI mostraron una amplia concordancia con los niveles registrados para el anterior índice (Fig. 6): en aquellas localidades con valores de VDSI inferiores a 4.5, este parámetro se incrementó exponencialmente según la relación $\text{VDSI} = 0.032721 + (0.550933 \times \text{RPLI}^{1/2})$ ($r=0.98$,

$P < 0.01$); sin embargo, en aquellas poblaciones donde el VDSI alcanzó su máximo valor (i.e. $VDSI = 4.5$) los niveles del RPLI oscilaron entre el 61% y el 97%.



El índice del Grado de Convolución del Oviducto (AOS) es un parámetro menos sensible a la contaminación que RPLI y VDSI. Aún así, más de la mitad de las poblaciones presentaron alguna hembra con oviducto anómalo; concretamente, 26 localidades mostraron valores del índice $AOS > 0$, localizándose 12 de dichas poblaciones en el interior de las bahías industriales de Ferrol, A Coruña y Vigo. Las localidades cuyas hembras no mostraron este rasgo de masculinización se situaron principalmente en áreas de costa abierta (e.g. Cabo Prior, Malpica o Fisterra) y también en la boca de las rías sin puertos importantes (e.g. Centroña y Arnela en la Ría de Ares-Betanzos o Fogareiro y Marmullo en la Ría de Muros). De este modo, la probabilidad de desarrollar este tipo de malformación varió significativamente como función del estadio de VDS (test de independencia chi-cuadrado, tabla de contingencia $OS \times VDS$, $P < 0.01$): los oviductos deformados estuvieron mayoritariamente restringidos a hembras que mostraban estadios de VDS avanzados (Fig. 7).

Finalmente, se registraron un total de 15 hembras con cápsulas abortadas en su interior. Dichas hembras se repartieron en 10 poblaciones distintas, 9 de las cuáles se localizaron en el interior de rías

con puertos importantes (Fig. 4, Tabla 2). Todas estas localidades se caracterizaron por valores elevados de los tres índices de imposex: el RPLI osciló entre el 53% y el 85%, el VDSI presentó valores ≥ 4.45 y el intervalo para el AOS fue de 0.1–1.0.

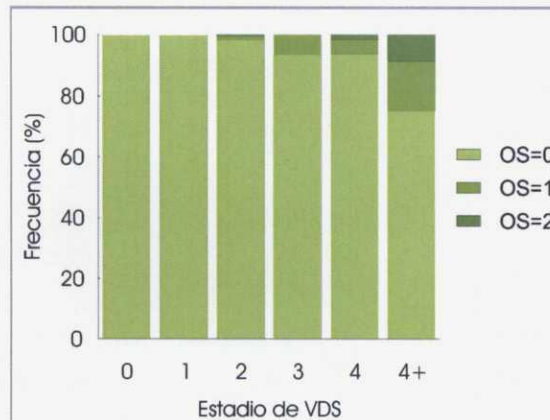


Figura 7.- Niveles de imposex. Frecuencia relativa de los estadios del Grado de Convulsión del Oviducto (estadios OS) observada para cada estadio de la Secuencia del Vaso Deferente (estadios VDS).

Localidad	%I	RPLI	VDSI	AOS	%Fest
COSTA NORTE					
1. Foz	100	37.6	3.67	0.0	-
2. Burela	100	97.1	4.50	0.0	-
3. San Cibrao	100	31.9	3.14	0.0	-
4. Viveiro	100	56.5	4.38	0.3	-
5. O Barqueiro	100	68.4	4.50	0.3	9.5
6. Cariño	88	3.1	0.88	0.0	-
7. Cedeira	100	44.8	4.38	0.2	-
8. Cabo Prior	9	0.1	0.09	0.0	-
RÍA DE FERROL					
9. O Seixo	100	82.0	4.45	0.4	5.3
10. Maniños	100	82.7	4.50	0.1	20.0
11. Mugar dos	100	61.3	4.50	0.5	-
RÍA DE BETANZOS					
12. Centroña	100	30.8	2.96	0.0	-
13. Sada	100	80.8	4.50	0.4	-
14. Veigue	100	25.4	2.70	0.0	-
15. Amela	84	8.1	1.16	0.0	-
RÍA DA CORUÑA					
16. Mera	100	66.7	4.46	0.3	9.1
17. Sta. Cruz	100	71.3	4.50	0.4	7.1
18. Sta. Cristina	100	69.1	4.50	0.0	-
19. Oza	100	75.4	4.50	0.1	-
20. San Antón	100	79.7	4.50	0.4	5.0
COSTA ESTE					
21. Malpica	0	0.0	0.00	0.0	-
22. Camelle	100	77.7	4.42	0.5	-
23. Camariñas	24	0.2	0.24	0.0	-
24. Muxía	100	23.9	2.77	0.0	-
25. Nemiña	29	0.0	0.29	0.0	-
26. Fisterra	60	2.8	0.60	0.0	-
27. Ézaro	71	3.9	0.97	0.0	-
RÍA DE MUROS					
28. Fogareiro	100	7.5	1.57	0.0	-
29. Muros	100	61.8	4.28	0.6	-
30. Creo	100	18.9	2.26	0.1	-
31. Freixo	100	24.8	2.86	0.1	-
32. Batuda	100	12.0	2.23	0.0	-
33. Marmullo	79	4.8	1.31	0.0	-

(continúa en la página 89)

Localidad	%I	RPLI	VDSI	AOS	%Fest
RÍA DE AROUSA					
34. Ribeira	100	52.8	4.48	0.4	4.0
35. Rianxo	100	35.8	3.11	0.5	-
36. Vilagarcía	100	9.6	1.82	0.0	-
37. Cambados	100	40.6	3.48	0.0	-
38. A Toxa	100	17.7	2.68	0.1	-
RÍA DE PONTEVEDRA					
39. Sanxenxo	100	51.6	4.23	0.2	-
40. Poio	100	62.8	4.26	0.4	-
41. Marín	100	60.8	4.48	0.3	5.0
RÍA DE VIGO					
42. Cangas	100	70.8	4.48	0.9	5.0
43. Rande	100	68.9	4.50	0.2	-
44. Bouzas	100	84.5	4.50	0.2	10.0
45. Samil	100	43.4	4.36	0.1	-
46. Canido	100	66.5	4.50	0.6	-
Máximo	100	97.1	4.50	0.9	20.0
Mínimo	0	0.0	0.00	0.0	0.0
Media	90	43.0	3.20	0.2	1.7
Desviación típica	24.9	29.79	1.54	0.23	3.95

Tabla 2.- Niveles de imposex. Porcentaje de hembras afectadas en cada localidad (%I); valores obtenidos para los tres índices de imposex (RPLI, VDSI y AOS); y porcentaje de hembras con cápsulas abortadas (%Fest).

4.3. NIVELES DE BUTILESTÁNNICOS (BTs) EN TEJIDOS

Las concentraciones medias de butilestánnicos (TBT, DBT y MBT) en tejidos de hembras de 27 localidades se recogen en la Tabla 3 y se representan gráficamente en la Figura 8. Mientras que el TPhT no pudo detectarse en ninguna muestra, los tres butilestánnicos (BTs) estuvieron presentes en todas las poblaciones analizadas, observándose un amplio rango de concentraciones: niveles totales (Σ BTs) superiores a 1000 ng Sn/g PS fueron registrados en las localidades de Sada, San Antón o Bouzas, mientras que, otras poblaciones como Cabo Prior o Malpica mostraron concentraciones totales (Σ BTs) inferiores a 50 ng Sn/g PS.

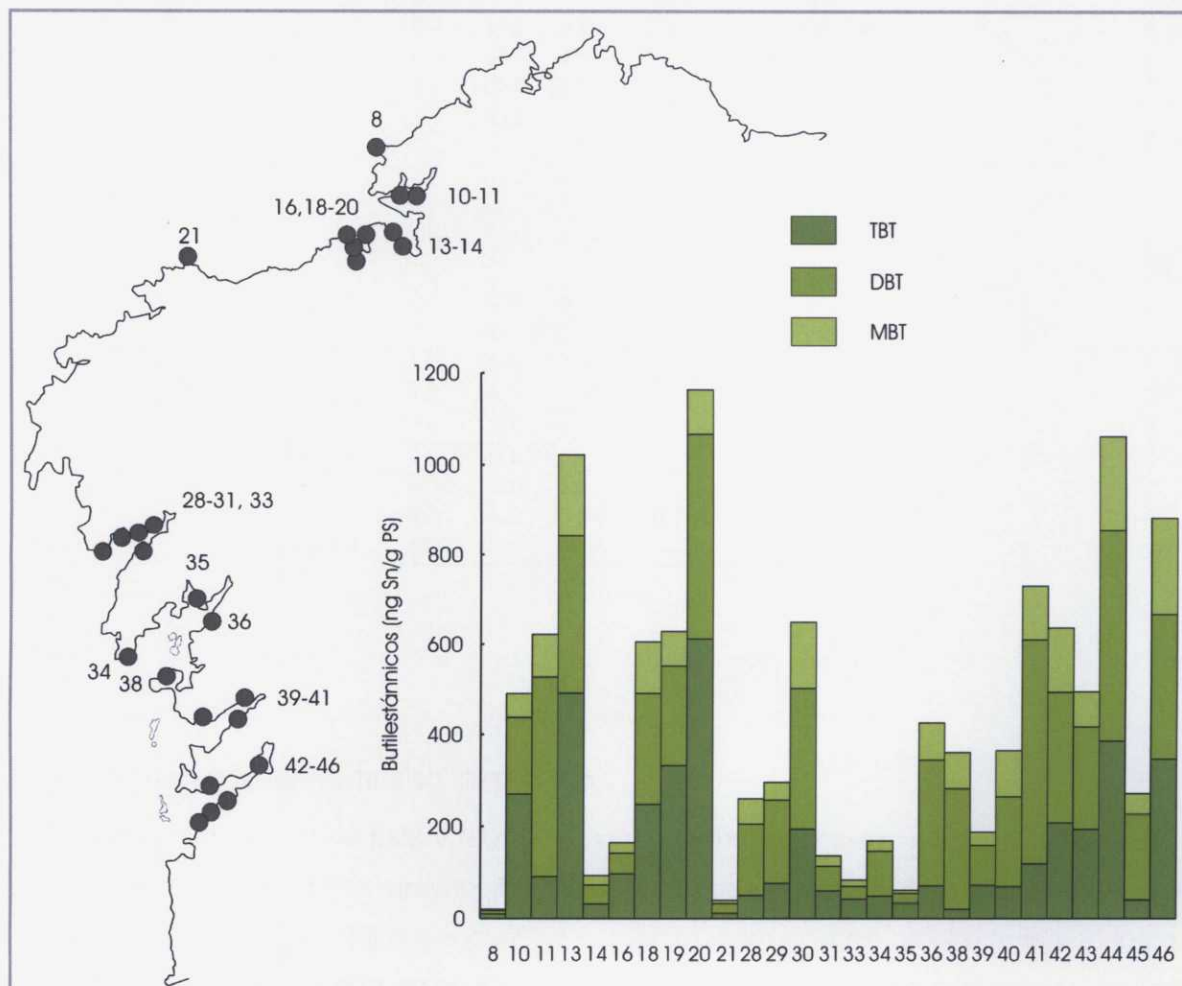


Figura 8.- Niveles de butilestánicos (BTs) en tejidos. Situación de las poblaciones para las cuáles se cuantificó la concentración de organoestánicos en tejidos y niveles obtenidos de los mismos. (8) Cabo Prior, (10) Maniños, (11) Mugar dos, (13) Sada, (14) Veigue, (16) Mera, (18) Sta. Cristina, (19) Oza, (20) San Antón, (21) Malpica, (28) Fogareiro, (29) Muros, (30) Creio, (31) Freixo, (33) Marmullo, (34) Ribeira, (35) Rianxo, (36) Vilagarcía, (38) A Toxa, (39) Sanxenxo, (40) Poio, (41) Marín, (42) Cangas, (43) Rande, (44) Bouzas, (45) Samil, (46) Canido.

Localidad	TBT	DBT	MBT
COSTA NORTE			
8. Cabo Prior	10	7	3
RÍA DE FERROL			
10. Maniños	270	168	52
11. Mugarlos	90	436	95
RÍA DE BETANZOS			
13. Sada	491	351	180
14. Veigue	32	40	21
RÍA DA CORUÑA			
16. Mera	97	45	23
18. Sta. Cristina	248	242	116
19. Oza	331	221	77
20. San Antón	613	453	98
COSTA ESTE			
21. Malpica	11	21	7
RÍA DE MUROS			
28. Fogareiro	50	156	54
29. Muros	75	182	38
30. Creo	194	307	148
31. Freixo	59	53	23
33. Marmullo	42	27	14
RÍA DE AROUSA			
34. Ribeira	49	97	23
35. Rianxo	34	20	6
36. Vilagarcía	70	274	82
38. A Toxa	21	261	78
RÍA DE PONTEVEDRA			
39. Sanxenxo	72	87	29
40. Poio	69	196	100
41. Marín	118	493	119
RÍA DE VIGO			
42. Cangas	208	286	143
43. Rande	193	224	78
44. Bouzas	386	469	207
45. Samil	41	187	45
46. Canido	346	321	217
Máximo	613	493	217
Mínimo	10	7	3
Media	156	208	77
Desviación típica	158.7	148.6	61.5

Tabla 3.- Niveles de butilestánicos (BTs) en tejidos. Concentración media de estannanos (ng Sn/g PS) en tejidos de hembras de *Nassarius reticulatus*.

El análisis individual de cada compuesto también reveló una amplia variabilidad entre las poblaciones: los niveles de TBT oscilaron entre 613 ng Sn/g PS (San Antón) y 10 ng Sn/g PS (Cabo Prior); las concentraciones máxima y mínima para el DBT fueron 493 ng Sn/g PS (Marín) y 7 ng Sn/g PS (Cabo Prior); finalmente, los niveles de MBT se situaron entre 217 ng Sn/g PS (Canido) y 3 ng Sn/g PS (Cabo Prior).

Además, también se observó una considerable variabilidad entre las poblaciones en lo relativo a las relaciones que las distintas especies de compuestos guardaban entre sí: en algunas localidades la concentración de TBT fue mayor que la de su inmediato producto de degradación, *i.e.* DBT, y ésta a su vez fue mayor que la de MBT (*e.g.* Maniños o Sada); en otras localidades el mayor aporte de estaño provenía del DBT seguido del TBT y en menor medida del MBT (*e.g.* Rande o Bouzas); por último, para cierto número de localidades las concentraciones de los tres compuestos siguieron la relación DBT>MBT>TBT (*e.g.* A Toxa); en ningún caso la principal contribución residió en el MBT. De este modo, si bien pudieron establecerse correlaciones lineales significativas entre la concentración de TBT y las concentraciones de sus productos de degradación, los coeficientes de correlación de dichas asociaciones fueron moderados ($r=0.64$, $P=0.0003$ y $r=0.68$, $P=0.0001$ para el DBT y el MBT respectivamente).

4.4. RELACIÓN ENTRE LOS ÍNDICES BIOLÓGICOS Y LA CONTAMINACIÓN

Las localidades de San Antón y Sada exhibieron los mayores niveles de TBT (613 y 491 ng Sn/g PS respectivamente); dichas poblaciones también mostraron un imposex severo: RPLI ~80%, VDSI=4.5 y AOS ~0.4. De igual modo, en aquellas poblaciones donde se registraron las concentraciones tisulares más bajas la incidencia del imposex fue escasa: en Malpica, la única localidad sin hembras afectadas, la concentración media fue de 11 ng Sn/g PS, y en Cabo Prior, con los tres índices tomando valores próximos o iguales a cero (RPLI=0.1%, VDSI=0.09, AOS=0), dicha concentración fue de 10 ng Sn/g PS.

Dada la probada especificidad del TBT como inductor del desarrollo del imposex en hembras de gasterópodos, se analizó la relación existente entre los distintos índices utilizados para cuantificar los

niveles de imposex de las poblaciones y la contaminación (medida como concentración media del compuesto en los tejidos de las hembras):

- Tanto el RPLI como el VDSI correlacionaron de modo significativo con los niveles tisulares de TBT ($RPLI = 21.83 \ln [TBT] - 49.4$, $r=0.86$, $p<0.0001$ y $VDSI = 0.973 \ln [TBT] - 0.846$, $r=0.76$, $p<0.0001$). Sin embargo, la asociación existente entre ambos índices y el contenido tisular de TBT parece describirse mejor según una relación bifásica (Tabla 4). En el primero de dichos índices pudo observarse un comportamiento marcadamente distinto para niveles tisulares de TBT inferiores y superiores a 100 ng Sn/g PS: el RPLI se incrementó de modo abrupto, siguiendo un modelo lineal, por debajo de tales concentraciones del contaminante en tejidos, mientras que para niveles superiores el incremento, también lineal, fue mucho más suave (ver Fig. 9a). En el caso del VDSI también pudo observarse un incremento brusco, mas logarítmico, para niveles tisulares de TBT inferiores a los 100 ng Sn/g PS, pero concentraciones mayores ocasionaron una saturación de dicho índice (ver Fig. 9b).
- La mejor relación entre AOS y niveles tisulares de TBT siguió igualmente un modelo logarítmico (Figura 9c); no obstante, el coeficiente de correlación obtenido fue muy bajo (Tabla 4).

La localidad de Creo mostró un comportamiento atípico, con valores de imposex anormalmente bajos para sus niveles tisulares del contaminante; las muestras de distintas especies de dicha localidad, situada bajo la influencia directa de un astillero, han mostrado siempre concentraciones anómalas de BTs (Ruiz et al. 1998, Ruiz et al. 2005). Así pues, dicha población fue tratada como un dato atípico (*outlier*) y se excluyó de los análisis. También resultan destacables los valores de imposex y concentración media de TBT obtenidos para la localidad de Malpica: a pesar de que no se halló ningún ejemplar afectado, el contenido tisular de TBT de sus hembras superó los 10 ng Sn/g PS, un hecho que corrobora la moderada sensibilidad de la especie frente a este tipo de contaminación.

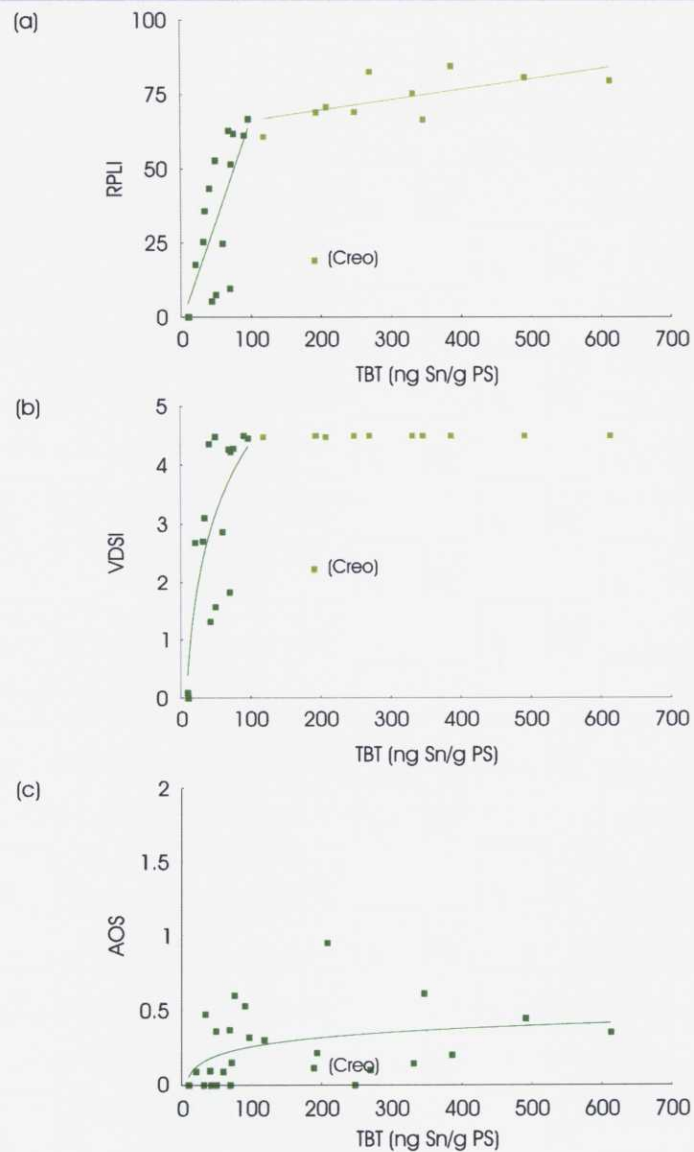


Figura 9.- Relación entre los índices biológicos y la contaminación. Concentración de TBT en tejidos de hembras versus (a) Índice de la Longitud Relativa del Pene (RPLI), (b) Índice de la Secuencia del Vaso Deferente (VDSI) y (c) Índice del Grado de Convulsión del Oviducto (AOS). Ver Tabla 4 para más detalles y significación de los modelos.

Variable respuesta	Fuente de variación	SC	gl	F	P	r	Modelo
RPLI (<100 ng Sn/g PS)	Modelo	4910.51	1	16.52	0.0012	0.73	RPLI = 0.6866 [TBT] - 2.3343
	Residual	4160.43	14				
RPLI (>100 ng Sn/g PS)	Modelo	249.403	1	6.32	0.0361	0.66	RPLI = 0.0352 [TBT] + 62.6338
	Residual	315.497	8				
VDSI (<100 ng Sn/g PS)	Modelo	21.0979	1	18.56	<0.001	0.76	VDSI = 1.719 Ln [TBT] - 3.542
	Residual	15.9155	14				
AOS	Modelo	0.2416	1	4.57	0.0430	0.40	AOS = 0.0873 Ln [TBT] - 0.1464
	Residual	1.2698	24				

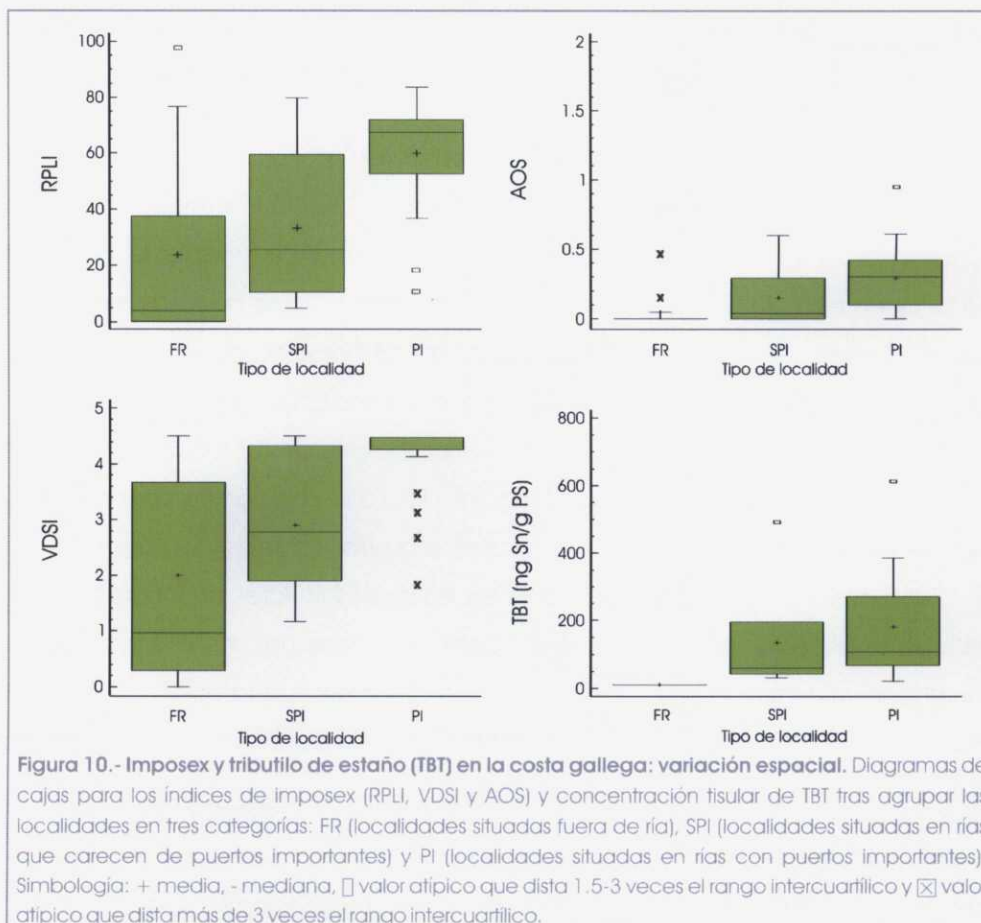
Tabla 4.- Relación entre los índices biológicos y la contaminación. Relación entre concentración de TBT en tejidos (ng Sn/g PS) y nivel de imposex observado en las poblaciones (RPLI, VDSI y AOS). SC: suma de cuadrados, gl: grados de libertad, r: coeficiente de correlación.

4.5. IMPOSEX Y TRIBUTO DE ESTAÑO (TBT) EN LA COSTA GALLEGA: VARIACIÓN ESPACIAL

Con la finalidad de estudiar la variación geográfica del binomio imposex – TBT, las 46 localidades estudiadas fueron agrupadas en tres categorías distintas, tal y como se establece en la Tabla 1: (i) localidades situadas en áreas de costa abierta o fuera de ría –FR–, (ii) localidades situadas en rías que carecen de puertos importantes –SPI–, y (iii) localidades situadas en rías que albergan en su interior puertos importantes –PI–. La información obtenida a partir de dicho análisis para cada parámetro (RPLI, VDSI, AOS y concentración tisular de TBT) se representa gráficamente en la Figura 10 y es resumida a continuación:

- Índice de la Longitud Relativa del Pene. El RPLI medio de aquellas poblaciones clasificadas como FR fue de 25 ± 32 , dicho valor ascendió a 33 ± 27 en el grupo de localidades SPI y se situó cerca del 60% (60 ± 21) en la categoría de localidades PI. La variabilidad fue muy alta en los tres grupos destacando en el primero de ellos la localidad de Burela con un RPLI del 97% y en el tercero las poblaciones de A Toxa y Vilagarcía con valores inferiores al 20%. Pese a estos valores atípicos, un test de Kruskal–Wallis reveló diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los tres grupos de localidades para un nivel de confianza del 95% ($H=12.8975$, $P=0.0016$).

- Índice de la Secuencia del Vaso Deferente. Los valores VDSI medios en cada grupo fueron 2.0 ± 1.8 para aquellas localidades situadas en costa abierta, 2.9 ± 1.3 para las localizadas en el interior de rías sin puertos importantes y 4.1 ± 0.7 para las localizadas en el interior de rías con puertos importantes. De nuevo la variabilidad fue elevada: las localidades situadas en el primer grupo presentaron valores en toda la amplitud del índice (i.e. 0–4.5) mientras que las situadas en el segundo grupo mostraron valores comprendidos entre ~ 1 y 4.5; en el tercer grupo, a pesar de que la variabilidad fue menor, cuatro localidades (todas situadas en el interior de la Ría de Arousa) presentaron valores inusualmente bajos. Al igual que en el caso del RPLI, un test de Kruskal–Wallis reveló diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los tres grupos para un nivel de confianza del 95% ($H=15.2264$, $P=0.0005$).
- Índice del Grado de Convolución del Oviducto. Como ya se había observado para los dos anteriores índices, el AOS medio de las localidades situadas en áreas de costa abierta (0.05 ± 0.13) fue menor que el mostrado por las localidades situadas en el interior de rías sin puertos importantes (0.15 ± 0.21) y éste a su vez menor que el mostrado por las localidades situadas en el interior de rías con puertos importantes (0.29 ± 0.23). Las localidades de Camelle y Cedeira (FR) presentaron valores de AOS inusualmente elevados para su categoría y lo mismo ocurrió con la localidad de Cangas situada en el grupo PI. La comparación de las medianas de los tres grupos de localidades mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% ($H=13.5283$, $P=0.0012$).
- Concentración tisular de TBT (sólo 27 localidades). En el primer grupo la concentración media de TBT fue de 10 ± 1 ng Sn/g PS ($n=2$), en el segundo grupo dicha concentración fue igual a 135 ± 166 ng Sn/g PS ($n=7$) y en el tercero ascendió a 181 ± 160 ng Sn/g PS ($n=18$). La localidad de Sada, a pesar de situarse en el grupo SPI, mostró una concentración tisular de TBT elevada. Nuevamente, un test de Kruskal–Wallis reveló diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos ($H= 6.1634$, $P=0.04588$).



4.6. IMPOSEX Y BUTILESTÁNNICOS (BTs) EN LA COSTA GALLEGA: VARIACIÓN TEMPORAL

El primer estudio de biomonitorización de organoestánicos a lo largo de la costa gallega, utilizando *Nassarius reticulatus* como especie bioindicadora, se llevó a cabo entre los meses de Julio de 1998 y Enero de 1999 (Barreiro et al. 2001). Este trabajo mostró que la contaminación por TBT afectaba de modo severo incluso a las poblaciones de una especie reconocida como moderadamente sensible: 11 de las 15 localidades muestreadas exhibieron valores de RPLI superiores al 75%, mientras que

en 10 los niveles del VDSI fueron mayores que 4; además, en 6 localidades las concentraciones tisulares de TBT excedieron los 1000 ng Sn/g PS y únicamente en 3 fueron inferiores a los 500 ng Sn/g PS.

En el año 2000 se acometió un nuevo estudio en la región con este gasterópodo (Ruiz et al. 2005): puesto que en la anterior campaña se había observado que la identificación de ambos sexos resultaba más sencilla durante el periodo anual de actividad sexual de la especie, la recogida de las muestras tuvo lugar en esta ocasión durante los meses de febrero-abril; además, en base a la experiencia adquirida, también se llevó a cabo un periodo de 48 horas de depuración de los individuos previo a su disección. En resumen, 13 de las 26 localidades estudiadas mostraron valores del RPLI que excedían el 75%, si bien en ninguna población los niveles tisulares de TBT fueron superiores a los 1000 ng Sn/g PS y únicamente en 5 superaron los 500 ng Sn/g PS. La comparación de los niveles de imposex y organoestánicos para las 7 localidades comunes a ambos estudios (*i.e.* Barreiro et al. 2001 *versus* Ruiz et al. 2005) revela un descenso importante en los niveles tisulares del contaminante, mas dudoso en lo relativo al imposex. No obstante, tales comparaciones deben ser tomadas con cautela dadas las diferencias existentes entre ambos estudios en relación con la época de recogida de las muestras y el procesamiento de las mismas (*i.e.* periodo de depuración).

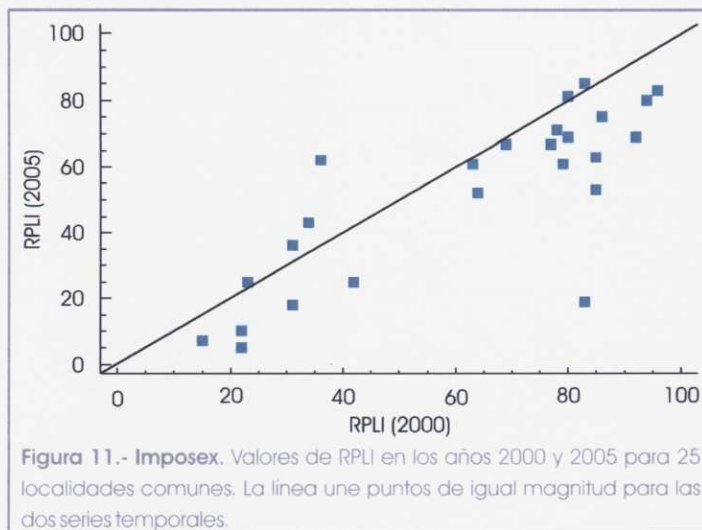
Durante el transcurso del presente estudio, los 26 lugares muestreados en el año 2000 fueron nuevamente visitados, aunque únicamente en 25 de ellos pudieron obtenerse muestras. Puesto que en ambas campañas se utilizaron protocolos idénticos, ambos conjuntos de datos se comparan a continuación con la finalidad de estudiar la variación temporal de este tipo de contaminación en la región (Tabla 5).

Localidad	2000						2005					
	RPLI	[TBT]	[DBT]	[MBT]	ΣBTs	BDI	RPLI	[TBT]	[DBT]	[MBT]	ΣBTs	BDI
Maniños	96	643	475	213	1332	1.07	83	270	168	52	489	0.82
Mugardos	79	547	256	54	857	0.57	61	90	436	95	621	5.90
Sada	80	479	353	29	862	0.80	81	491	351	180	1022	1.08
Veigue	23	83	74	9	166	1.00	25	32	40	21	93	1.91
Mera	77	137	172	58	367	1.68	67	97	45	23	165	0.70
Sta. Cristina	92	614	409	145	1168	0.90	69	248	242	116	606	1.44
Oza	86	549	363	136	1047	0.91	75	331	221	77	629	0.90
San Antón	94	856	842	393	2090	1.44	80	613	453	98	1164	0.90
Fogareiro	15	83	48	nq	132	0.63	7	50	156	54	259	4.20
Muros	36	101	87	11	199	0.97	62	75	182	38	295	2.93
Creo	83	373	497	263	1132	2.04	19	194	307	148	649	2.35
Freixo	42	120	65	8	192	0.61	25	59	53	23	135	1.29
Marmullo	22	124	76	nq	201	0.65	5	42	27	14	83	0.98
Ribeira	85	230	181	18	429	0.87	53	49	97	23	169	2.45
Rianxo	31	104	44	nq	150	0.46	36	34	20	6	60	0.76
Vilagarcía	22	62	63	9	134	1.16	10	70	274	82	426	5.09
A Toxa	31	48	64	16	128	1.67	18	21	261	78	360	16.14
Sanxenxo	64	188	134	nq	323	0.73	52	72	87	29	187	1.61
Poio	85	289	182	75	545	0.89	63	69	196	100	364	4.29
Marín	63	168	113	9	290	0.73	61	118	493	119	730	5.19
Cangas	78	319	159	nq	480	0.51	71	208	286	143	636	2.06
Rande	80	185	189	73	448	1.42	69	193	224	78	495	1.56
Bouzas	83	380	312	37	729	0.92	85	386	469	207	1062	1.75
Samil	34	72	76	15	163	1.26	43	41	187	45	272	5.66
Canido	69	125	137	72	335	1.67	67	346	321	217	884	1.55
Máximo	96	856	842	393	2090	2.04	85	613	493	217	1164	16.14
Mínimo	15	48	44	4	128	0.46	5	21	20	6	60	0.70
Media	62	275	215	67	556	1.02	52	168	224	83	474	2.94
Desviación típica	27.2	222.7	189.4	96.6	489.8	0.42	25.8	159.3	143.2	60.3	321.3	3.21

Tabla 5.- Imposax y niveles de butilestánnicos (BTs) en la costa gallega: variación temporal. Comparaciones temporales de los niveles de imposax (RPLI); concentraciones tisulares de butilestánnicos (TBT, DBT, MBT y ΣBTs; ng Sn/g PS); e Índice de Degradación de Butilestánnicos ($BDI = (DBT + MBT) / TBT$, ver texto) entre los años 2000 y 2005 para 25 localidades comunes. nq: no cuantificable (para los cálculos oportunos se utilizó el valor de la mitad de su límite de cuantificación; puesto que dicho límite de cuantificación para el catión MBT en el año 2000 fue de 7.5 - 8, se empleó el valor de 4).

4.6.1. IMPOSEX

La evolución temporal de los niveles de imposex se analizó utilizando el índice RPLI ya que, de los tres índices empleados, éste fue el que presentó en ambas ocasiones un mejor poder discriminatorio y una mejor relación con los niveles de TBT. En la Figura 11 se representan los valores obtenidos para dicho índice en las dos campañas. Un descenso en los niveles de imposex resulta evidente en la mayoría de las localidades a lo largo de estos cinco años: en 17 poblaciones los valores del RPLI en 2005 son menores que los registrados en el año 2000, en 5 poblaciones dichos valores se mantienen estables (Sada, Veigue, Marín, Bouzas y Canido) y, únicamente en 3 localidades muestran un incremento (Muros, Samil y Rianxo).



4.6.2. BUTILESTÁNNICOS (BTs)

La comparación temporal de las concentraciones tisulares medias de TBT revela, de acuerdo con lo observado para el RPLI, un descenso generalizado: únicamente una población mostró niveles de TBT en el año 2005 superiores a los registrados en el año 2000 (Canido), mientras que en 20 pudo observarse una caída considerable a lo largo de dicho periodo; en las 4 localidades restantes (Sada, Vilagarcía, Rande y Bouzas) dichos niveles no parecieron sufrir variación alguna (Fig. 12.a.).

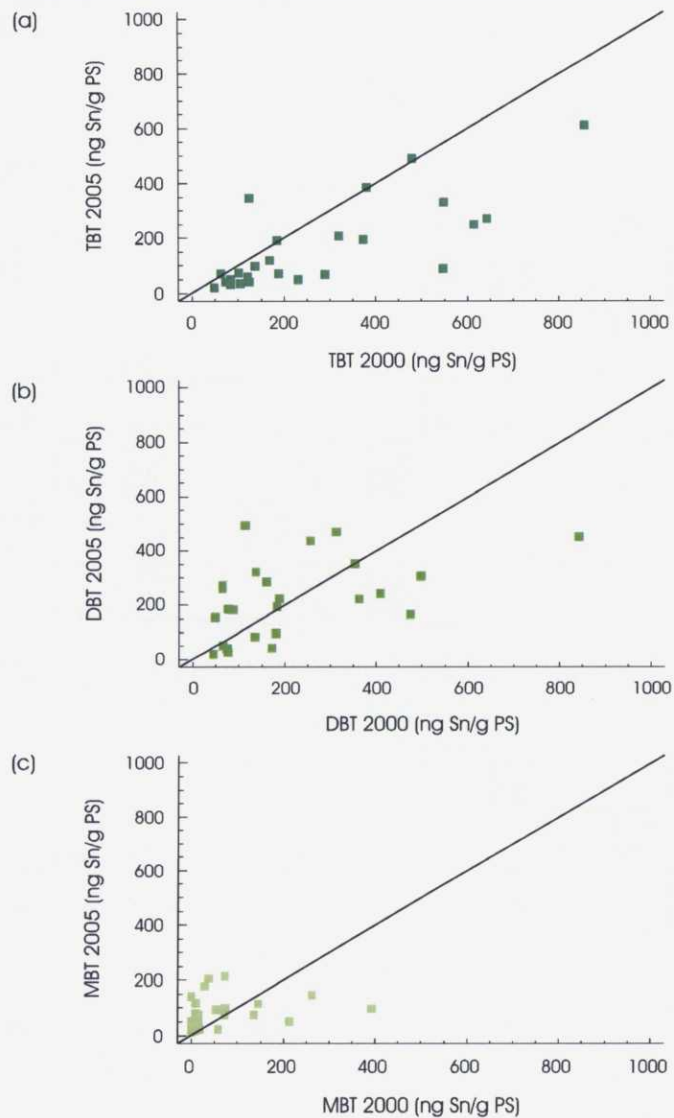
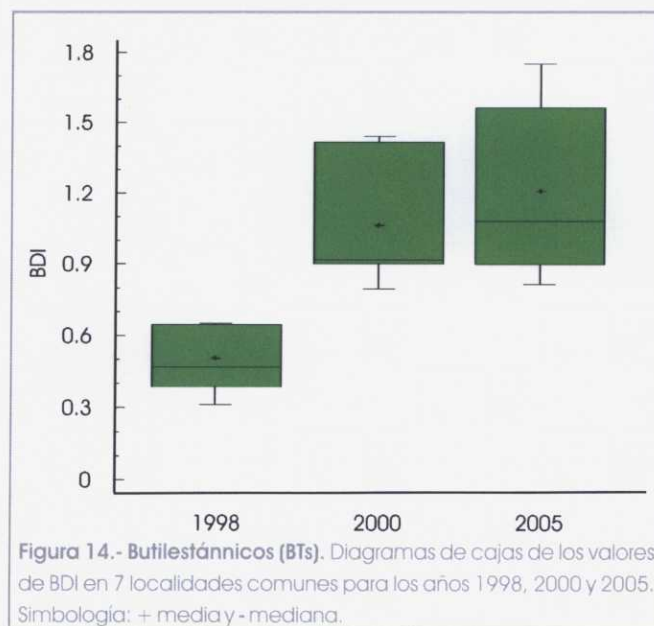
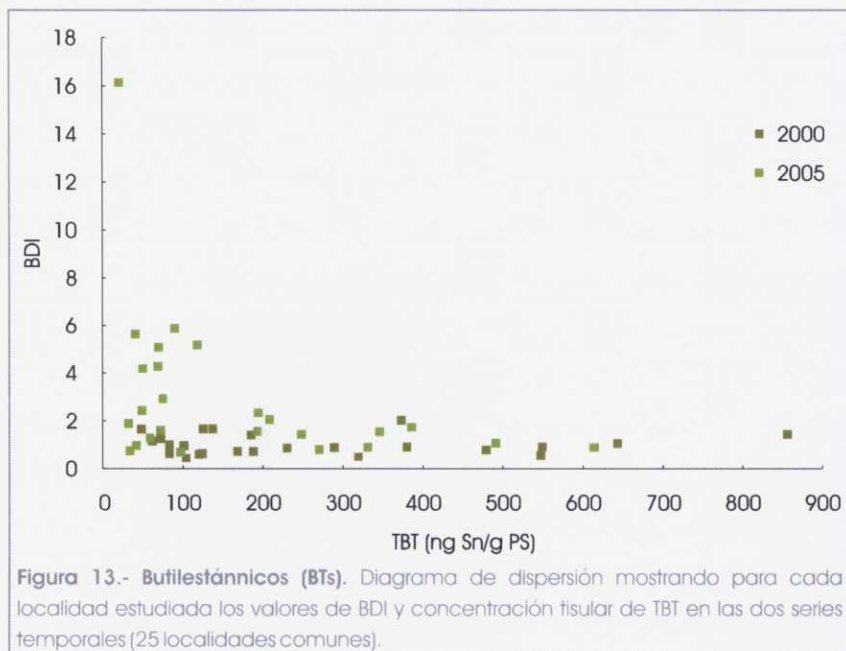


Figura 12.- Butilestánicos (BTs). Concentraciones medias de estannanos en los años 2000 y 2005 para 25 localidades comunes: (a) TBT, (b) DBT y (c) MBT. Cada línea une puntos de igual magnitud para las dos series temporales en cuestión.

En contraposición, los niveles tisulares de los productos de degradación parecieron incrementarse durante el periodo 2000–2005 (Fig. 12b y 12c). Así, en el caso del DBT se produjo un aumento en 12 localidades, mientras que en el caso del MBT dicho incremento se registró en 19 poblaciones. Esta situación se refleja en la variación de la contribución relativa de cada especie individual al total de organoestánicos: en el año 2000 dichas contribuciones son $52 \pm 10\%$ para el TBT, $40 \pm 6\%$ para el DBT y $9 \pm 7\%$ para el MBT, mientras que en el año 2005 son $35 \pm 15\%$, $48 \pm 14\%$ y $17 \pm 5\%$ para el TBT, el DBT y el MBT respectivamente. Dicha variación pueden integrarse en un único índice: el Índice de Degradación de Butilestánicos o BDI ($BDI = [DBT + MBT] / TBT$), un parámetro que se emplea habitualmente para reflejar cuan degradada (o, al contrario, cuan fresca) es la contaminación butilestánica de un área determinada (Diez et al. 2002). De este modo, cuando se comparan los valores de dicho índice en las dos campañas, es posible observar un incremento en el año 2005 para la mayoría de las muestras (Tabla 5); en conjunto, el valor medio del BDI para las 25 localidades en el año 2000 fue de 1.02 ± 0.42 , mientras que, dicho valor medio en el año 2005 fue de 2.94 ± 3.21 . En la Figura 13 se representan, para ambas series temporales, los valores registrados en las 25 localidades para el BDI y la concentración tisular de TBT: resulta evidente que en el año 2005, en aquellos lugares menos contaminados, los derivados (*i.e.* DBT y MBT) aventajan al compuesto parental (*i.e.* TBT). No obstante, es probable que la tendencia observada durante el periodo 2000–2005 tenga su origen en un momento anterior: el valor medio del BDI para las 7 localidades comunes al estudio de Barreiro et al. (2001) y las dos series temporales aquí comparadas es de 0.50 ± 0.14 en el año 1998–1999, mientras que dicho valor medio asciende en el año 2000 a 1.07 ± 0.26 y, en el año 2005, muestra un valor de 1.21 ± 0.37 (Fig. 14).

Finalmente, cabe destacar que en algunas localidades los niveles de DBT en el año 2005 fueron semejantes al total de estannanos registrado en la anterior campaña (Fogareiro, Muros, Samil y Canido) o incluso llegaron a duplicar dicho nivel (Vilagarcía, A Toxa y Marín) (Tabla 5).



4.6.3. RELACIÓN IMPOSEX – TRIBUTOLO DE ESTAÑO (TBT)

Al igual que ocurrió en el presente estudio, en el año 2000 pudo establecerse una relación bifásica entre los niveles tisulares de TBT y los valores del índice RPLI: para concentraciones del contaminante en tejidos inferiores a los 200 ng Sn/g PS, el RPLI se incrementó de modo lineal según la relación $RPLI = 0.4051 [TBT] - 1.8827$ ($r=0.78$; $p<0.001$; $n=15$), mientras que, para niveles del contaminante por encima de dicho umbral el incremento del RPLI fue también lineal, pero mucho menos abrupto ($RPLI = 0.0215 [TBT] + 75.2468$; $r=0.64$; $p<0.05$; $n=11$) (Ruiz et al. 2005). Cuando ambas relaciones se comparan (2000 versus 2005) es posible observar que en el año 2005 los puntos de la gráfica se desplazan claramente hacia la izquierda, esto es, hacia concentraciones tisulares del contaminante más bajas; sin embargo, pese a que también es posible observar un descenso en los valores de la ordenada (i.e. en el índice RPLI), dicho detrimento es mucho menos acusado (Fig. 15). En definitiva, resulta evidente que en un escenario de declive de la contaminación (como lo es el periodo 2000–2005 en la costa gallega) la concentración de TBT en tejidos disminuye más rápidamente que los niveles de imposex (concretamente que los niveles del RPLI).

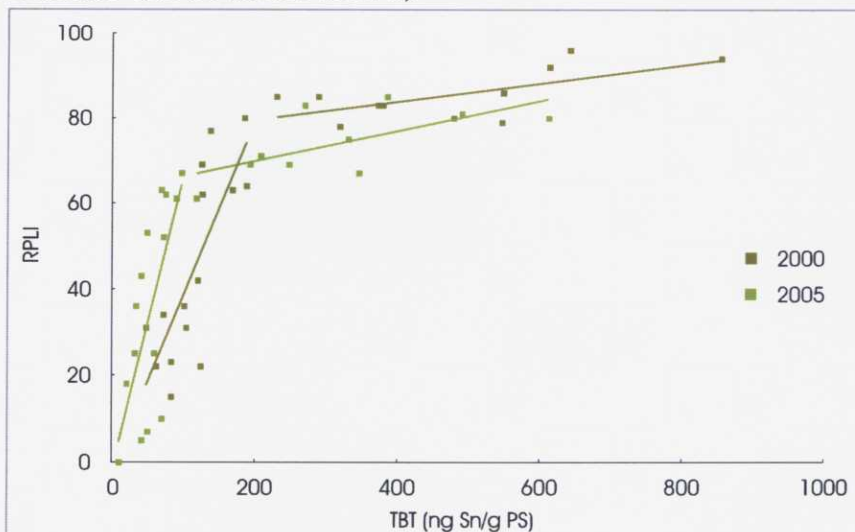
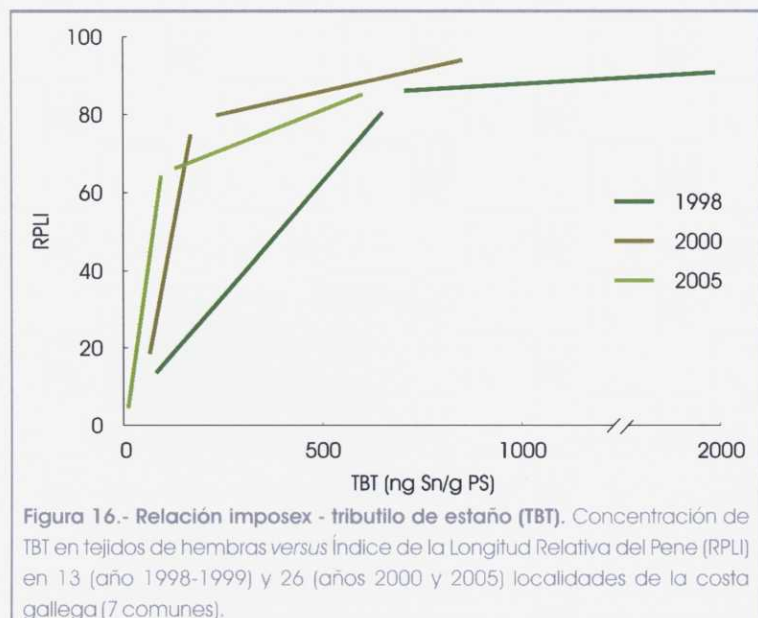


Figura 15.- Relación imposex - tributolo de estaño (TBT). Concentración de TBT en tejidos de hembras versus Índice de la Longitud Relativa del Pene (RPLI) en 26 (año 2000) y 26 (año 2005) localidades de la costa gallega (24 comunes).

De nuevo, la anterior observación tomó mayor fuerza cuando se tuvieron en cuenta los datos derivados de la campaña llevada a cabo en el año 1998-1999 (Fig. 16).



5. DISCUSIÓN

5.1.- UTILIDAD BIOINDICADORA DE LA ESPECIE

Aunque el imposex ha sido registrado en más de 190 especies de gasterópodos (Shi et al. 2005b), sólo en unas pocas ha sido investigado con detalle y empleado en estudios de biomonitorización. Así, en el ámbito del litoral atlántico europeo, tales estudios han utilizado principalmente como especie bioindicadora el murícido *Nucella lapillus* (L.): e.g. Islandia (Svavarsson & Skarphéðinsdóttir 1995, Svavarsson 2000), Noruega (Folsviksrk et al. 1999), Irlanda (Minchin et al. 1996, Minchin & Minchin 1997), Inglaterra (Gibbs et al. 1991, Douglas 1993), Francia (Huet et al. 1996, Huet et al. 2004), España (Ruiz et al. 1998, Barreiro et al. 1999) o Portugal (Santos et al. 2000, Santos et al. 2002, Galante-Oliveira et al. 2006). Dicha especie constituye un excelente bioindicador de la contaminación por organoestánicos, no obstante, su uso no está exento de algunas desventajas (Stroben et al. 1992a, Barroso et al. 2000):

- Su distribución está restringida a costas rocosas y no tolera aguas salobres (Fretter & Graham 1985). Se encuentra por tanto ausente de importantes tramos del litoral europeo (e.g. Bélgica, Holanda, Dinamarca o Mar Báltico). Para una escala geográfica menor, tales características también comportan su ausencia dentro de estuarios (áreas de estudio de elevada importancia puesto que normalmente constituyen focos de contaminación).
- Exhibe una elevada sensibilidad a la contaminación por TBT, lo que ha provocado la extinción de sus poblaciones en áreas sometidas a una polución severa (Gibbs & Bryan 1986). Además, en localidades con niveles moderados de contaminación, tal sensibilidad también ocasiona una saturación de los índices que evalúan la intensidad del imposex.

- Finalmente, en algunas poblaciones de los alrededores del Canal de la Mancha y del sur de Europa se ha registrado una anomalía genética, denominada Síndrome de Dumpton, que puede ocasionar subdesarrollo de los caracteres sexuales masculinos (*i.e.* pene y vaso deferente) en los machos y, por extensión, en las hembras afectadas por imposex (Gibbs 1993). La inclusión de tales hembras en estudios de biomonitorización ocasiona una subestima de los índices de imposex y, en consecuencia, de los niveles del contaminante.

Como ya había sido establecido en esta (Barreiro et al. 2001) y otras regiones del Atlántico Norte Europeo (Stroben et al. 1992b, Bryan et al. 1993, Barroso et al. 2002a), el presente trabajo muestra que los estudios de biomonitorización basados en *Nassarius reticulatus* constituyen un importante complemento de aquéllos que utilizan *Nucella lapillus*:

- *N. reticulatus* es una especie eurihalina que vive ligada al sedimento. De este modo sus poblaciones proliferan tanto en zonas arenosas del intermareal rocoso como en otras con predominio de fango dentro de estuarios. Así, en el presente trabajo fue posible el estudio de numerosas poblaciones esparcidas a lo largo de toda la costa de Galicia, abarcando dichas poblaciones áreas de costa expuesta (*e.g.* Cariño, Cabo Prior, Malpica o Muxía) y también áreas localizadas en la zona más interna de las rías (*e.g.* Rande, Poio o Vilagarcía). Es más, puesto que esta especie puede vivir incluso en el infralitoral, su utilidad no se restringe únicamente a áreas costeras y también es posible su empleo en aquéllos estudios que se ocupan de la plataforma continental (*e.g.* Rato et al. 2006).
- La menor sensibilidad de *N. reticulatus* a la contaminación por TBT permite la persistencia de sus poblaciones en zonas severamente contaminadas donde *N. lapillus* ha desaparecido. De esta manera, en el presente estudio se examinaron localidades confinadas en el interior de estuarios y próximas a grandes puertos comerciales donde las poblaciones de *N. lapillus* se suponen extinguidas (*e.g.* O Seixo, Maniños, San Antón y Oza; Quintela et al. 2000).
- Por último, las poblaciones gallegas de *N. lapillus* muestran una elevada frecuencia de individuos afectados por el Síndrome de Dumpton (Quintela et al. 2002) y, si bien se ha puesto espe-

cial atención en excluir dichos individuos de campañas de biomonitorización, el estudio paralelo de *N. reticulatus* en dichas poblaciones constituye un importante apoyo.

5.2.- IMPOSEX EN *NASSARIUS RETICULATUS* versus CONTAMINACIÓN POR TBT

Diversas experiencias llevadas a cabo en el laboratorio han vinculado inequívocamente el desarrollo del imposex en *Nassarius reticulatus* con la contaminación por TBT (Stroben et al. 1992a, Bettin et al. 1996, Oehlmann & Bettin 1996, Barroso et al. 2002b). Dicha relación también ha sido establecida a partir del estudio de poblaciones naturales donde los niveles de imposex muestran una correlación altamente positiva con el contenido tisular de TBT (Bryan et al. 1993, Barreiro et al. 2001, Pessoa et al. 2001, Barroso et al. 2002a, Barroso et al. 2005, Ruiz et al. 2005, Sousa et al. 2005) o, con las concentraciones de dicho compuesto en el agua (Bryan et al. 1993, Barroso et al. 2000) o los sedimentos (Barroso et al. 2000). Los datos obtenidos en este estudio nuevamente ratifican la tesis de que el imposex en *N. reticulatus* es una respuesta altamente específica a la contaminación por TBT.

Al igual que ocurre en otras especies de prosobranchios, el imposex en *Nassarius reticulatus* se caracteriza por el desarrollo de un pene y un conducto deferente. Puesto que dicho desarrollo muestra una relación dosis-dependiente con los niveles del contaminante, los índices utilizados para evaluar la intensidad de tales rasgos en hembras afectadas (*i.e.* RPLI y VDSI) constituyen poderosas herramientas de biomonitorización. Esta utilidad ha sido corroborada en el presente estudio donde ambos parámetros mostraron correlaciones altamente significativas con el contenido tisular de TBT. No obstante, también pudieron detectarse diferencias entre ambos índices en relación con la sensibilidad a los niveles del contaminante: el VDSI exhibió una saturación para niveles de contaminación próximos a los 100 ng Sn/g PS mientras que el RPLI manifestó un claro incremento para niveles inferiores a dicha concentración y también, si bien más suave, para concentraciones mayores. Esta diferencia entre ambos índices se observa claramente cuando se enfrentan sus respectivos valores en cada una de las localidades estudiadas: en aquellas localidades donde el VDSI ha alcanzado su máximo (*i.e.* 4.5) los valores del RPLI se mueven en el rango 60–100%. Pese a que este comportamiento había sido

descrito con anterioridad (Stroben et al. 1992b), algunos autores califican al RPLI como un parámetro menos informativo que el VDSI, dada la variabilidad estacional que puede mostrar la longitud del pene de los machos (Stroben et al. 1992b). No obstante, en el presente trabajo el RPLI puede considerarse como el índice más útil con la finalidad de describir los niveles de imposex de la especie puesto que dicha posible variabilidad se minimizó concentrando temporalmente las capturas. En último lugar cabe destacar que, por primera vez, se registraron niveles tisulares de TBT en poblaciones con respuesta de imposex nula (Malpica, 11 ng Sn/g PS) o prácticamente nula (Cabo Prior, 10 ng Sn / g PS); dichas observaciones corroboran la moderada sensibilidad de la especie y permiten establecer de modo tentativo en torno a 10 ng Sn/g PS el umbral de concentración tisular con efectos observables al estereomicroscopio.

Junto con la presencia de pene y conducto deferente, las hembras de *Nassarius reticulatus* afectadas por imposex muestran un tercer rasgo de masculinización: los oviductos rectos (condición normal en hembras no afectadas) pasan a presentar un aspecto convolucionado, similar al que caracteriza la vesícula seminal masculina. Esta malformación parece restringida a los miembros de la familia Nassariidae (*Ilyanassa obsoleta*: Smith 1971, *N. reticulatus*: Barreiro et al. 2001, *Cyclope neritea*: Quintela et al. 2006) y se ha sugerido que constituye un rasgo de masculinización extremo, presente únicamente en aquellas hembras expuestas a una contaminación severa (Barreiro et al. 2001). En el presente estudio, los valores del Índice del Grado de Convolución del Oviducto (AOS), a diferencia de lo registrado para el RPLI y el VDSI, no mostraron una relación clara con los niveles del contaminante; ello contrasta con lo registrado para la especie en estudios anteriores (Barreiro et al. 2001, Barroso et al. 2002a, Sousa et al. 2005). No obstante, sí pudo observarse que el grado de masculinización representado por dicho parámetro estaba restringido a hembras que mostraban estadios de VDS avanzados: ninguna hembra con un VDS de 0 ó 1 presentó esta deformación pero, sin embargo, su frecuencia fue cercana al 2% en aquellas hembras con un VDS de 2, se situó en torno al 6% en el caso de VDS=3 ó 4 y rozó el 25% para las hembras que mostraban un VDS de 4.5.

Finalmente, se ha observado que estadios de imposex avanzados en las hembras de algunos prosobranchios pueden ocasionar una esterilidad funcional (Gibbs & Bryan 1986). En un primer momento se sugirió que dicha esterilidad afectaba únicamente a los miembros de la familia Muricidae: en estas especies, el tracto genital masculino sigue la misma ruta que el femenino dentro de la cavidad del manto y, en consecuencia, su imposición puede conllevar una desorganización de la condición normal de las hembras (Gibbs & Bryan 1996). Sin embargo, diversos estudios registraron también masas de cápsulas abortadas en hembras de *Nassarius reticulatus* (Huet et al. 1995, Barreiro et al. 2001, Barroso et al. 2002a, Sousa et al. 2005). La presencia de imposex severo en estas hembras junto con el aspecto de las masas abortadas (similar al registrado en especies como *Nucella lapillus* donde los efectos esterilizantes del TBT habían sido reconocidos) condujo a la hipótesis de que esta especie también podía sufrir esterilidad a causa del imposex (Barreiro et al. 2001); si bien el mecanismo subyacente no ha sido desvelado aún. En el presente estudio también fueron registradas hembras de *N. reticulatus* que portaban masas de cápsulas abortadas en el interior de la glándula de la cápsula. De acuerdo con lo establecido anteriormente, todas ellas exhibían un imposex avanzado ($RPLI=53-85\%$, $VDSI \geq 4.45$ y $AOS=0.1-1.0$); esto refuerza la hipótesis de que también esta especie puede presentar su capacidad reproductiva mermada a causa de la contaminación por TBT. Una situación similar ha sido descrita para *Cantharus cecillei* (Buccinidae); en esta especie se han registrado también masas de cápsulas abortadas en hembras que exhiben estadios de imposex avanzados, si bien no parecen existir impedimentos externos para que dichas cápsulas sean expulsadas (e.g. bloqueo de la vulva como consecuencia del crecimiento del conducto deferente, Shi et al. 2005a). Se ha sugerido que, tanto en la anterior especie como en *N. reticulatus*, dicha esterilidad podría ser debida a la existencia de excrecencias tisulares internas en el canal vaginal que ocasionarían un estrechamiento del mismo (Huet et al. 1995, Shi et al. 2005a).

5.3.- NIVELES ACTUALES DE CONTAMINACIÓN E IMPOSEX EN LA COSTA GALLEGA

El imposex en *Nassarius reticulatus* es aún un fenómeno ampliamente extendido a lo largo del litoral gallego: la norma en las poblaciones de la región fue una frecuencia de hembras masculiniza-

das del 100% y únicamente en una localidad no pudo registrarse esta anomalía. De esta manera, si bien las localidades más afectadas fueron aquéllas situadas en el interior de rías, la presencia de imposex también pudo constatararse en áreas de costa abierta, alejadas de potenciales fuentes de contaminación. Otros estudios recientes sobre esta especie moderadamente sensible también muestran que las poblaciones libres de imposex son la excepción en las costas europeas (Magnusson & Granmo 2004, Sousa et al. 2005, Wirzinger et al. 2007); de hecho, incluso se han registrado poblaciones de distintos gasterópodos afectadas por esta anomalía en áreas de mar abierto, cercanas a rutas de tráfico marítimo (e.g. Chiavarini et al. 2003, Ten Hallers-Tjabbes et al. 2003, Gomez-Ariza et al. 2006). El TBT continúa siendo pues un contaminante con efectos ubicuos, cuatro décadas después de su introducción en el medio marino costero y pese a las distintas medidas de regulación.

Además, la severidad del problema registrada en el presente estudio no se limitó únicamente a la presencia de imposex en la práctica totalidad de las poblaciones; la intensidad del fenómeno observada en numerosas localidades también resulta preocupante e indicativa de niveles elevados del contaminante. Así, por ejemplo, en 24 localidades la totalidad de las hembras estudiadas mostró vasos deferentes completos y penes de longitud considerable (*i.e.* VDSI=4–4.5), y en 10 de ellas se detectaron además hembras que portaban masas de cápsulas abortadas en el interior de la glándula de la cápsula. La costa de Galicia alberga tres grandes puertos comerciales en las Rías de Ferrol, A Coruña y Vigo; de modo predecible, los niveles más severos de imposex fueron registrados en las poblaciones más próximas a dichas instalaciones (O Seixo y Maniños -Ría de Ferrol-, San Antón y Oza -Ría de A Coruña-, Rande y Bouzas -Ría de Vigo-). No obstante, su influencia no se restringió únicamente a las anteriores localidades y niveles similares fueron también encontrados en otros enclaves de estos estuarios, incluyendo aquéllos situados en su parte más externa (e.g. Mera, Cangas o Canido). Las concentraciones tisulares de TBT registradas en las poblaciones de estas rías fueron similares a las obtenidas para la especie en áreas del sur de Inglaterra propensas a este tipo de contaminación a finales de la década de 1980, *i.e.* antes de que se regulara el uso de pinturas *antifouling* con base de TBT (Bryan et al. 1993). Niveles igualmente elevados de TBT en tejidos fueron registrados en el año 2003 en

poblaciones próximas a grandes puertos comerciales portugueses (Sousa et al. 2005), pero dichas concentraciones superaron en varios órdenes de magnitud lo registrado el mismo año en las inmediaciones de los principales puertos suecos (Magnusson & Granmo 2004). Además, otros puntos del litoral gallego mostraron también un imposex severo, comparable al exhibido por las poblaciones situadas en los anteriores estuarios. Ello sugiere que los niveles elevados de contaminación en la región no están limitados a las áreas de influencia del tráfico marítimo comercial. En algunas de estas localidades la fuente de TBT puede ser atribuida aún a la presencia de grandes embarcaciones: e.g. buques de la armada en la Ría de Pontevedra o grandes pesqueros y buques-factoría de túnidos en la Ría de Arousa y en la costa norte. Sin embargo, el origen de tales niveles del contaminante resulta más incierto en aquellas poblaciones que únicamente albergan puertos deportivos (e.g. Sada) o pequeños puertos pesqueros (e.g. Camelle),

Así, la situación observada en el presente estudio muestra que la aplicación de regulaciones parciales no limita localmente este tipo de contaminación como han sugerido algunos autores (Evans 1999, Evans & Nicholson 2000). Ello es particularmente cierto en el caso del litoral gallego donde el tráfico marítimo no se restringe únicamente a grandes buques comerciales: Galicia cuenta con una de las flotas pesqueras más grandes de la Unión Europea y, si bien una fracción importante de la misma está constituida por pequeñas embarcaciones sujetas a la legislación adoptada por España en el año 1990 (i.e. Directiva Comunitaria 89/677/CEE que prohíbe el uso de pinturas con TBT en barcos con eslora inferior a 25 m), otra fracción igualmente importante ha podido seguir utilizando este tipo de pinturas. Además, la presencia de imposex severo en áreas donde el tráfico de grandes embarcaciones es insignificante apunta otros posibles orígenes de la contaminación como, por ejemplo, incumplimiento de las medidas de regulación establecidas o posibles aportes de TBT a la columna de agua procedentes del sedimento.

Escenarios similares al descrito para la costa gallega se han observado en otras regiones de Europa (Barroso & Moreira 2002, Huet et al. 2004). En el caso concreto de España, un estudio de los distintos compartimentos ambientales en la bahía de Gijón mostró que la concentración media de TBT

en aguas del puerto deportivo duplicaba la obtenida para aguas del puerto comercial (88 ng/l *versus* 42 ng/l); además, en conjunto, un 75% de las muestras (incluyendo algunas tomadas en áreas de costa abierta) superaron los 7.4 ng/l (umbral del criterio de calidad US-EPA), y un 95% excedieron el umbral de toxicidad establecido para muchas especies marinas, *i.e.* 1 ng/l (Rodríguez-González et al. 2006). Por todo ello la IMO ha suscrito el “*Convenio Internacional para el Control de Sistemas Antiincrustantes Nocivos en Buques*”, a través del cual, queda prohibido el uso de pinturas con organoestánicos a partir del 1 de enero de 2003 con el objetivo de que a partir del 1 de enero de 2008 no quede un solo barco pintado con TBT; es más, con independencia de su ratificación, la Comisión Europea ha resuelto para sus países miembros la prohibición total desde el 1 de enero de 2003 (Directiva 2002/62/CE).

5.4.- TENDENCIA TEMPORAL

Pese a que la situación en el noroeste de la Península Ibérica continúa siendo preocupante, se ha producido un descenso considerable en los niveles de TBT e imposex en los últimos cinco años. En el año 2000 únicamente 5 poblaciones de *Nassarius reticulatus* mostraron niveles tisulares de TBT inferiores a los 100 ng Sn/g PS, la máxima concentración registrada superó los 800 ng Sn/g PS y en 11 poblaciones los valores del RPLI excedieron el 80%; sin embargo, en el año 2005, se detectaron niveles inferiores a los 100 ng Sn/g PS en 14 poblaciones, la concentración máxima observada no superó los 650 ng Sn/g PS y únicamente 4 muestras exhibieron valores de RPLI superiores al 80%. Si bien la prohibición total resuelta por la Comisión Europea (Directiva 2002/62/CE) ha entrado en vigor en el año 2003, resulta poco probable que sea ésta la responsable del anterior declive: (i) un periodo de tan sólo 2 años es insuficiente para observar sus efectos y, además, (ii) los datos disponibles apuntan a que dicho descenso viene produciéndose ya desde finales de la década de 1990. Sin embargo, es posible que la Directiva 2002/62/CE haya actuado de un modo indirecto, a través de su interacción con la prohibición parcial del año 1990 (Directiva 89/677/CEE). Esta última tan sólo restringió el uso de pinturas *antifouling* con TBT, prohibiendo su aplicación en embarcaciones con eslora inferior a 25 metros; de este modo, las pinturas siguieron disponibles en el mercado y ello posibilitó que la legislación no fuese

respetada. Sin embargo, ante la llegada de la prohibición total, es posible que el mercado reaccionara disminuyendo la oferta de pinturas con TBT y forzando por tanto su menor uso. Además, dicho descenso pudo verse favorecido también por factores ajenos a las legislaciones, tal y como han sugerido algunos autores para otras regiones europeas (Huet et al. 2004): (i) el uso de pinturas antiincrustantes que, si bien su principio activo es el TBT, muestran una tasa de lixiviado más lenta (i.e. copolímeros autopulimentantes) o (ii) las mejoras en el tratamiento de las aguas residuales procedentes de los astilleros.

La evolución temporal de la relación TBT *versus* RPLI registrada en el presente estudio para las costas de Galicia es muy similar a la que Bryan et al. (1993) encontraron para la especie en las costas del sur de Inglaterra. De este modo, por primera vez se corroboran las predicciones de estos autores evidenciando que no sólo la respuesta biológica (i.e. imposex) es consistente, si no que también lo es su comportamiento a lo largo del tiempo. En dicha relación es posible observar que el declive temporal resulta más conspicuo en las concentraciones tisulares del contaminante que en los niveles de imposex. Ello puede ser debido a que la vida media del TBT en los tejidos oscila entre los 2–3 meses (Stroben et al. 1992a) mientras que el imposex es un fenómeno irreversible (Stroben et al. 1992a) o, quizás, lentamente reversible (Bryan et al. 1993, Tester et al. 1996). Así, para una determinada población, los niveles de imposex exhibirán una mayor inercia, y su descenso será únicamente aparente a medida que las hembras más afectadas sean reemplazadas por nuevas generaciones; a su vez, dicho reemplazo vendrá determinado por las características propias del ciclo vital, particularmente, edad de maduración sexual y longevidad (Gibbs & Bryan 1996). En el caso concreto de *Nassarius reticulatus*, las hembras alcanzan la madurez sexual alrededor del cuarto año de vida (Tallmark 1980), de modo que, en un escenario de declive de la contaminación, los ejemplares menos afectados formarán parte de la población adulta únicamente tras un periodo de 48 meses; es más, puesto que la longevidad de la especie ha sido establecida en 10–15 años (Tallmark 1980), un descenso considerable en los niveles de imposex de la población no será conspicuo probablemente hasta más tiempo después, cuando muera una fracción importante de las hembras más viejas y afectadas. Los valores me-

dios de TBT y RPLI para las siete localidades comunes de las campañas 1998–1999, 2000 y 2005 (1221 ± 538 ng Sn/g PS y $88 \pm 3\%$, 530 ± 212 ng Sn/g PS y $87 \pm 6\%$, 362 ± 148 ng Sn/g PS y $77 \pm 6\%$ respectivamente) indican que, tras un periodo de 6 años, los niveles actuales de TBT y RPLI constituyen un 27% y un 88% de los niveles originales. De seguir con esta progresión cabría esperar que, tras más de 18 años, el RPLI de dichas localidades superase aún el 50% de los niveles originales. Como consecuencia de lo anteriormente expuesto, se ha sugerido que el parámetro más útil para detectar cambios cuando los niveles ambientales del contaminante descienden con cierta rapidez es el análisis de las concentraciones tisulares de TBT (Bryan et al. 1993). Si bien esta recomendación debe ser considerada, es igualmente importante tener en cuenta que los programas de monitorización modernos, tales como aquéllos promovidos por la Convención OSPAR (*Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic*), necesitan establecer nexos fiables entre los aportes del contaminante, sus niveles ambientales y sus efectos biológicos (Ruiz et al. 2005).

Es probable que la situación descrita en el presente trabajo para la costa gallega continúe mejorando en un futuro como consecuencia de la prohibición total. Sin embargo, no debe olvidarse que los niveles del contaminante siguen incrementándose en otros países, donde el uso de pinturas *anti-fouling* con TBT no ha sido legislado (e.g. Israel: Rilov et al. 2000, Tailandia: Bech 2002, o Brasil: Fernandez et al. 2004). Incluso en aquellas regiones donde se han establecido distintas regulaciones y parecen estar alcanzando el efecto deseado, existen aún motivos de preocupación. La vida media del TBT en la columna de agua oscila entre los 7 días y los 2 meses dependiendo del régimen térmico (Fent 1996), pero dicho compuesto puede prevalecer años almacenado en los sedimentos donde su tasa de degradación es mucho más lenta ($113\text{--}775$ días en sedimentos aeróbicos y decenas de años en sedimentos anaeróbicos, Dowson et al. 1993). De este modo, dichos sedimentos actúan como importantes depósitos de TBT (de Mora et al. 1995) que puede ser devuelto a la columna de agua por la actividad de la fauna excavadora u operaciones de dragado. Distintos estudios han establecido el potencial de los sedimentos contaminados como fuente de TBT a largo plazo. Por ejemplo, Santos et al. (2004) observaron que la frecuencia e intensidad del imposex en *Nassarius reticulatus* se in-

crementaba con la proximidad a un área donde se habían depositado sedimentos del dragado de un gran puerto portugués. Los datos obtenidos en el presente trabajo también sugieren que el TBT almacenado en los sedimentos podría estar actuando como fuente secundaria de contaminación. La comparación temporal de las concentraciones tisulares de organoestánicos muestra que mientras el TBT era el compuesto dominante en 2000, dicha dominancia a pasado a su inmediato producto de degradación en 2005. Esta situación no resulta extraña en un escenario de declive de la contaminación (Bryan et al. 1993). Sin embargo, sí resulta sorprendente que 7 de las localidades estudiadas en 2005 presenten un contenido en DBT similar, o incluso superior, al total de estannanos registrado en 2000. Estos hechos indican que el patrón de bioacumulación en dichas localidades se ha visto modificado durante el periodo estudiado y que una nueva fuente de contaminación, rica en derivados (como podrían ser los sedimentos, Sarradin et al. 1995) podría está actuando en la región.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alzieu C, Heral M, Thibaud Y, Dardignac MJ, Feuillet M (1982) Influence des peintures antisalissures a base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huître *Crassostrea gigas*. Rev Trav Inst Peches Marit 45: 101-116
- Axiak V, Vella AJ, Micallef D, Chircop P (1995) Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. Mar Biol 121: 685-692
- Bailey SK, Davies IM (1988) Tributyltin contamination around an oil terminal in Sullom Voe (Shetland). Environ Pollut 55: 161-172
- Bailey SK, Davies IM (1989) The effects of tributyltin on dogwhelks (*Nucella lapillus*) from Scottish coastal waters. J Mar Biol Ass U K 69: 335-354
- Barreiro R, González R, Quintela M, Ruiz JM (2001) Imposex, organotin bioaccumulation and sterility of female *Nassarius reticulatus* in polluted areas of NW Spain. Mar Ecol Prog Ser 218: 203-212
- Barreiro R, Quintela M, Ruiz JM (1999) Aphally and imposex in *Nucella lapillus* from Galicia (NW Spain): incidence, geographical distribution and consequences for the biomonitoring of TBT contamination. Mar Ecol Prog Ser 185: 229-238
- Barroso CM, Moreira MH (1998) Reproductive cycle of *Nassarius reticulatus* in the Ria de Aveiro, Portugal: implications for imposex studies. J Mar Biol Ass U K 78: 1233-1246
- Barroso CM, Moreira MH (2002) Spatial and temporal changes of TBT pollution along the Portuguese coast: inefficacy of the EEC directive 89/677. Mar Pollut Bull 44: 480-486
- Barroso CM, Moreira MH, Bebianno MJ (2002a) Imposex, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* (L.) from the Portuguese coast. Mar Ecol Prog Ser 230: 127-135
- Barroso CM, Moreira MH, Gibbs PE (2000) Comparison of imposex and intersex development in four prosobranch species for TBT monitoring of a southern European estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal). Mar Ecol Prog Ser 201: 221-232
- Barroso CM, Reis-Henriques MA, Ferreira MS, Gibbs PE, Moreira MH (2005) Organotin contamination, imposex and androgen/oestrogen ratios in natural populations of *Nassarius reticulatus* along a ship density gradient. Appl Organomet Chem 19: 1141-1148
- Barroso CM, Reis-Henriques MA, Ferreira MS, Moreira MH (2002b) The effectiveness of some compounds derived from antifouling paints in promoting imposex in *Nassarius reticulatus*. J Mar Biol Ass UK 82: 249-255

- Batley GE, Fuhua C, Brockbank CI, Flegg KJ (1989) Accumulation of tributyltin by the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*. Aust J Mar Freshw Res 40: 49-54
- Beaumont AR, Newman PB (1986) Low levels of tributyltin reduce growth of marine micro-algae. Mar Pollut Bull 17: 457-461
- Bech M (2002) A survey of imposex in muricids from 1996 to 2000 and identification of optimal indicators of tributyltin contamination along the east coast of Phuket Island, Thailand. Mar Pollut Bull 44: 887-896
- Besteiro Rodríguez B (2004) El desarrollo del turismo náutico en Galicia. Cuadernos de Turismo 13: 145-163
- Bettin C, Oehlmann J, Stroben E (1996) TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. Helgol Meeresunters 50: 299-317
- Birchenough AC, Barnes CS, Evans SM, Hinz H, Krönke I, Moss C (2002a) A review and assessment of tributyltin contamination in the North Sea, based on surveys of butyltin tissue burdens and imposex/intersex in four species of neogastropods. Mar Pollut Bull 44: 534-543
- Birchenough AC, Evans SM, Moss C, Welch R (2002b) Re-colonisation and recovery of populations of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.) on shores formerly subject to severe TBT contamination. Mar Pollut Bull 44: 652-659
- Blaber SJM (1970) The occurrence of a penis-like out-growth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). Proc Malacol Soc London 39: 231-233
- Bryan GW, Burt GR, Gibbs PE, Pascoe PL (1993) *Nassarius reticulatus* (Nassariidae: Gastropoda) as an indicator of tributyltin pollution before and after TBT restrictions. J Mar Biol Ass UK 73: 913-929
- Bryan GW, Gibbs PE, Burt GR, Hummerstone LG (1987) The effects of tributyltin (TBT) accumulation on adult dog-whelks, *Nucella lapillus*: long-term field and laboratory experiments. J Mar Biol Ass UK 67: 525-544
- Bryan GW, Gibbs PE, Hugget RJ, Curtis LA, Bailey DS, Dauer DM (1989) Effects of tributyltin pollution on the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*, from the York River and Sarah Creek, Chesapeake Bay. Mar Pollut Bull 20: 458-462
- Bryan GW, Gibbs PE, Hummerstone LG, Burt GR (1986) The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around South-West England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. J Mar Biol Ass UK 66: 611-640
- Champ MA (2000) A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. Sci Tot Environ 258: 21-71
- Chiavarini S, Massanisso P, Nicolai P, Nobili C, Morabito R (2003) Butyltins concentration levels and imposex occurrence in snails from the Sicilian coasts (Italy). Chemosphere 50: 311-319
- de Mora SJ, Stewart C, Phillips D (1995) Sources and rate of degradation of tri(*n*-butyl)tin in marine sediments near Auckland, New Zealand. Mar Pollut Bull 30: 50-57
- Diez S, Abalos M, Bayona JM (2002) Organotin contamination in sediments from the Western Mediterranean enclosures following 10 years of TBT regulation. Water Res 36: 905-918
- Douglas EW (1993) Assessments of imposex in the dogwhelk (*Nucella lapillus*) and tributyltin along the NE coast of England. Invertebr Reprod Dev 24: 243-248

- Dowson PH, Bubbs JM, Lester JN (1993) A Study of the Partitioning and Sorptive Behavior of Butyltins in the Aquatic Environment. *Appl Organomet Chem* 7: 623-633
- Evans SM (1999) Tributyltin pollution: the catastrophe that never happened. *Mar Pollut Bull* 38: 629-636
- Evans SM, Evans PM, Leksono T (1996) Widespread recovery of dogwhelks, *Nucella lapillus* (L.), from tributyltin contamination in the North Sea and Clyde Sea. *Mar Pollut Bull* 32: 263-269
- Evans SM, Nicholson GJ (2000) The use of imposex to assess tributyltin contamination in coastal waters and open seas. *Sci Tot Environ* 258: 73-80
- Feare CJ (1970) The reproductive cycle of the dog whelk (*Nucella lapillus*). *Proc Malacol Soc London* 39: 125-137
- Fent K (1996) Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit Rev Toxicol* 26: 1-117
- Fernandez MA, de Luca Rebello Wagener A, Limaverde AM, Scofield AL, Pinheiro FM, Rodrigues E (2004) Imposex and surface sediment speciation: A combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Mar Environ Res* 59: 435-452
- Fioroni P, Oehlmann J, Stroben E (1991) The pseudohermaphroditism of prosobranchs: morphological aspects. *Zool Anz* 226: 1-26
- Folviksrk N, Berge JA, Brevik EM, Walday M (1999) Quantification of organotin compounds and determination of imposex in populations of dogwhelks (*Nucella lapillus*) from Norway. *Chemosphere* 38: 681-691
- Franco Leis M (2006) La miticultura en Galicia: una actividad de éxito y con futuro. *Revista Galega de Economía* 15: 1-6
- Fretter V, Graham A (1985) The prosobranch molluscs of Britain and Denmark. Part 8. Neogastropoda. *J Molluscan Stud*: 435-556
- Galante-Oliveira S, Langston WJ, Burt GR, Pereira ME, Barroso CM (2006) Imposex and organotin body burden in the dog-whelk (*Nucella lapillus* L.) along the Portuguese coast. *Appl Organomet Chem* 20: 1-4
- Gibbs PE (1993) A mail genital defect in the dog-whelk, *Nucella lapillus* (Neogastropoda), favouring survival in a TBT-polluted area. *J Mar Biol Ass UK* 73: 667-678
- Gibbs PE, Bryan GW (1986) Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. *J Mar Biol Ass UK* 66: 767-777
- Gibbs PE, Bryan GW (1996) TBT-induced imposex in neogastropod snails: masculinization to mass extinction. In: de Mora SJ (ed) *Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant*. Cambridge University Press, Cambridge, p 212-236
- Gibbs PE, Bryan GW, Pascoe PL, Burt GR (1987) The use of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *J Mar Biol Ass UK* 67: 507-523
- Gibbs PE, Bryan GW, Spence S (1991) The impact of tributyltin (TBT) pollution on the *Nucella lapillus* (Gastropoda) populations around the coast of South-East England. *Oceanol Acta Esp.*: 257-261
- Goldberg ED (1986) TBT, an environmental dilemma. *Environment* 28: 17-42
- Gomez-Ariza JL, Santos MM, Morales E, Giraldez I, Sanchez-Rodas D, Vieira N, Kemp JF, Boon JP, Ten-Hallers-Tjabbes CC (2006) Organotin contamination in the Atlantic Ocean off the Iberian Peninsula in relation to shipping. *Chemosphere* 64: 1100-1108

- Harding MJC, Rodger GK, Davies IM, Moore JJ (1997) Partial recovery of the dogwhelk (*Nucella lapillus*) in Sullom Voe, Shetland from tributyltin contamination. *Mar Environ Res* 44: 285-304
- Horiguchi T, Shiraishi H, Shimizu M, Morita M (1994) Imposex and organotin compounds in *Thais clavigera* and *T. bronni* in Japan. *J Mar Biol Ass UK* 74: 651-669
- Houston RS (1971) Reproductive biology of *Thais emarginata* (Deshayes, 1939) and *Thais canaliculata* (Duclos, 1832). *Veliger* 13: 348-357
- Huet M, Fioroni P, Oehlmann J, Stroben E (1995) Comparison of imposex response in three prosobranch species. *Hydrobiologia* 309: 29-35
- Huet M, Paulet YM, Clavier J (2004) Imposex in *Nucella lapillus*: A ten year survey in NW Brittany. *Mar Ecol Prog Ser* 270: 153-161
- Huet M, Paulet YM, Glémagrec M (1996) Tributyltin (TBT) pollution in the coastal waters of West Brittany as indicated by imposex in *Nucella lapillus*. *Mar Environ Res* 41: 157-167
- Magnusson M, Granmo Å (2004) Investigation of imposex on the Swedish west coast using *Nassarius reticulatus* as a bioindicator species. Report from Göteborg University and Naturvårdsverket.
- Matthiessen P, Waldock R, Thain JE, Waite ME, Scrope-Howe S (1994) Changes in periwinkle (*Littorina littorea*) populations following the ban on TBT-based antifoulings on small boats in the United Kingdom. *Ecotoxicol Environ Saf* 30: 180-194
- Minchin A, Minchin D (1997) Dispersal of TBT from a fishing port determined using the dogwhelk *Nucella lapillus* as an indicator. *Environ Technol* 18: 1225-1234
- Minchin D, Stroben E, Oehlmann J, Bauer B, Duggan CB, Keatinge M (1996) Biological indicators used to map organotin contamination in Cork Harbour, Ireland. *Mar Pollut Bull* 32: 188-195
- Oehlmann J, Bettin C (1996) TBT-induced imposex and the role of steroids in marine snails. *Malacol Rev*: 157-161
- Okoshi J, Mori K, Nomura T (1987) Characteristics of shell chamber formation between the two local races in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 67: 313-320
- Peña J, Guerra M, Gaudencio MJ, Kendall M (1988) The occurrence of imposex in the gastropod *Nucella lapillus* at sites in Spain and Portugal. *Lurralde* 11: 1-7
- Pessoa MF, Fernando A, Oliveira JS (2001) Use of imposex (Pseudohermaphroditism) as indicator of the occurrence of organotin compounds in Portuguese coastal waters-Sado and Mira estuaries. *Environ Toxicol* 16: 234-241
- Poli G, Salvat B, Streiff W (1971) Aspect particulier de la sexualité chez *Ocenebra erinacea* (Mollusque, Gastéropode, Prosobranchie). *Halietis* 1: 29-30
- Quintela M, Barreiro R, Ruiz JM (2000) The use of *Nucella lapillus* (L.) transplanted in cages to monitor tributyltin (TBT) pollution. *Sci Tot Environ* 247: 227-237
- Quintela M, Barreiro R, Ruiz JM (2002) Dumpton Syndrome reduces tributyltin (TBT) sterilising effect on *Nucella lapillus* (L.) by limiting the development of imposed vas deferens. *Mar Environ Res* 54: 657-660
- Quintela M, Couceiro L, Ruiz JM, Barreiro R (2006) Discovery of imposex in the gastropod *Cyclope neritea* now invading Galicia (north-west Spain). *J Mar Biol Ass UK* 86: 1171-1173

- Rato M, Sousa A, Quinta R, Langston WJ, Barroso CM (2006) Assessment of inshore/offshore TBT pollution gradients in the NW Portugal continental shelf using *Nassarius reticulatus* as a bioindicator. *Environ Toxicol Chem* 12: 3213-3220
- Rees CM, Brady BA, Fabris GJ (2001) Incidence of imposex in *Thais orbita* from Port Phillip Bay (Victoria, Australia), following 10 years of regulation on use of TBT. *Mar Pollut Bull* 42: 873-878
- Reitsemä TJ, Thompson JAJ, Scholtens P, Spickett JT (2002) Further recovery of northeast Pacific neogastropods from imposex related to tributyltin contamination. *Mar Pollut Bull* 44: 257-261
- Rilov G, Gasith A, Evans SM, Benayahu Y (2000) Unregulated use of TBT-based antifouling paints in Israel (eastern Mediterranean): high contamination and imposex levels in two species of marine gastropods. *Mar Ecol Prog Ser* 192: 229-238
- Rodriguez-Gonzalez P, Encinar JR, Alonso JIG, Sanz-Medel A (2006) Contamination of the coastal waters of Gijón (North West Spain) by butyltin compounds. *Wat Air Soil Pollut* 174: 127-139
- Ruiz JM, Barreiro R, González JJ (2005) Biomonitoring organotin pollution with gastropods and mussels. *Mar Ecol Prog Ser* 287: 169-176
- Ruiz JM, Quintela M, Barreiro R (1998) Ubiquitous imposex and organotin bioaccumulation in gastropods *Nucella lapillus* (L.) from Galicia (NW Spain): A possible effect of nearshore shipping. *Mar Ecol Prog Ser* 164: 237-244
- Santos MM, Ten Hallers-Tjabbes CC, Santos AM, Vieira N (2002) Imposex en *Nucella lapillus*, a bioindicator for TBT contamination: re-survey along the Portuguese coast to monitor the effectiveness of EU regulation. *J Sea Res* 48: 217-223
- Santos MM, Vieira N, Reis-Henriques MA, Santos AM, Gomez-Ariza JL, Giraldez I, ten Hallers-Tjabbes CC (2004) Imposex and butyltin contamination off the Oporto Coast (NW Portugal): a possible effect of the discharge of dredged material. *Environment International* 30: 793-798
- Santos MM, Vieira N, Santos AM (2000) Imposex in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) along the Portuguese coast. *Mar Pollut Bull* 40: 643-646
- Sarradin PM, Lapaquellerie Y, Astruc A, Latouche C, Astruc M (1995) Long term behaviour and degradation kinetics of tributyltin in a marina sediment. *Sci Tot Environ* 170: 59-70
- Shi H, Huang C, Yu X, Zhu S (2005a) An updated scheme of imposex for *Cantharus cecillei* (Gastropoda: Buccinidae) and a new mechanism leading to the sterilization of imposex-affected females. *Mar Biol* 146: 717-723
- Shi H, Huang CJ, Zhu SX, Yu XJ, Xie WY (2005b) Generalized system of imposex and reproductive failure in female gastropods of coastal waters of mainland China. *Mar Ecol Prog Ser* 304: 179-189
- Short JW, Rice SD, Brodersen CC, Stickle WB (1989) Occurrence of tri-nbutyltin-caused imposex in the North Pacific marine snail *Nucella lima* in Auke Bay, Alaska. *Mar Biol* 102: 291-297
- Smith BS (1971) Sexuality in the American mud snail, *Nassarius obsoletus* Say. *Proc Malacol Soc London* 39: 377-378
- Smith BS (1981a) Male characteristics on female mud snails caused by antifouling bottom paints. *J Appl Toxicol* 1: 22-25
- Smith BS (1981b) Reproductive anomalies in stenoglossan snails related to pollution from marinas. *J Appl Toxicol* 1: 15-21

- Smith BS (1981c) Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus*= *Ilyanassa obsoleta*. J Appl Toxicol 1: 141-144
- Smith PJ (1996) Selective decline in imposex levels in the dogwhelk *Lepsiella scobina* following a ban on the use of TBT antifoulants in New Zealand. Mar Pollut Bull 4: 362-365
- Smith PJ, McVeagh M (1991) Widespread organotin pollution in New Zealand coastal waters as indicated by imposex in dogwhelks. Mar Pollut Bull 22: 409-413
- Sousa A, Mendo S, Barroso CM (2005) Imposex and organotin contamination in *Nassarius reticulatus* (L.) along the Portuguese coast. Appl Organomet Chem 19: 315-323
- Spence SK, Hawkins SJ, Santos RS (1990) The mollusc *Thais haemastoma* - an exhibitor of 'imposex' and potential biological indicator of tributyltin pollution. PSZNI Marine Ecology 11: 147-156
- Stephenson MD, Smith DR, Goetzl J, Ichikawa G, Martin M (1986) Growth abnormalities in mussels and oysters from areas with high levels of tributyltin in San Diego Bay OCEANS '86, Organotin Symposium. Institute of Electric and Electronics Engineers, New York, p 1246-1251
- Stroben E, Oehlmann J, Fioroni P (1992a) *Hinia reticulata* and *Nucella lapillus*. Comparison of two gastropod tributyltin bioindicators. Mar Biol 114: 289-296
- Stroben E, Oehlmann J, Fioroni P (1992b) The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributyltin pollution. Mar Biol 113: 625-636
- Svavarsson J (2000) Imposex in the dogwhelk (*Nucella lapillus*) due to TBT contamination: Improvement at high latitudes. Mar Pollut Bull 40: 893-897
- Svavarsson J, Skarphéðinsdóttir H (1995) Imposex in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) in Icelandic waters. Sarsia 80: 35-40
- Szpunar J, Schmitt VO, Lobinski R (1996) Rapid speciation of butyltin compounds in sediments and biomaterials by GC-AEDm, after microwave-assisted leaching-digestion. J Anal Atomic Spec 11: 193-199
- Tallmark B (1980) Population dynamics of *Nassarius reticulatus* (Gastropoda, Prosobranchia) in Gullmar Fjord, Sweeden. Mar Ecol Prog Ser 3: 51-62
- Tanabe S, Prudente M, Takahiko Mizuno JH, Noboyuki M (1998) Butyltin contamination in marine mammals from North Pacific and Asian coastal waters. Environ Sci Technol 32: 193-198
- Ten Hallers-Tjabbes CC, Wegener J-W, van Hattum BAGM, Kemp JF, Ten Hallers E, Reitsema TJ, Boon JP (2003) Imposex and organotin concentrations in *Buccinum undatum* and *Neptunea antiqua* from the North Sea: relationship to shipping density and hydrographical conditions. Mar Environ Res 55: 203-233
- Tester M, Ellis DV, Thompson JAJ (1996) Neogastropod imposex for monitoring recovery from marine TBT contamination. Environ Toxicol Chem 15: 560-567
- Waldock MJ, Thain JE (1983) Shell thickening in *Crassostrea gigas*: organotin antifouling or sediment induced? Mar Pollut Bull 14: 411-415
- Wirzinger G, Vogt C, Bachmann J, Hasenbank M, Liers C, Stark C, Ziebart S, Oehlmann J (2007) Imposex of the netted whelk *Nassarius reticulatus* (Prosobranchia) in Brittany along a transect from a point source. Cah Biol Mar 48: 85-94

C 2

A

P

I

T

U

L

O



CAPÍTULO 2: ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DEL PROSOBRANQUIO *NASSARIUS RETICULATUS* (L.) EN LA COSTA DE GALICIA (NO PENÍNSULA IBÉRICA) REVELADA CON MARCADORES RAPD¹

1. INTRODUCCIÓN

2. OBJETIVOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ESCALA GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO Y RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

3.2. EXTRACCIÓN DEL ADN

3.3. REACCIÓN RAPD

3.4. ELECTROFORESIS Y VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS

3.5. ESTUDIO PILOTO E IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS RAPD

3.6. ANÁLISIS DE DATOS

3.6.1. DIVERSIDAD GENÉTICA

3.6.2. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y ESTRUCTURA GEOGRÁFICA

3.6.2.1. AMOVA

3.6.2.2. TEST DE MANTEL

3.6.2.3. ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS

3.6.2.4. ESCALAMIENTO MULTIDIMENSIONAL NO MÉTRICO

¹ Una versión de este capítulo ha sido publicada como: Barreiro R, Couceiro L, Quintela M, Ruiz JM (2006) Population genetic structure of the prosobranch *Nassarius reticulatus* (L.) in a ria seascape (NW Iberian Peninsula) as revealed by RAPD analysis. Mar Biol 148:1051-1060

4. RESULTADOS

4.1. PERFILES RAPD EN *NASSARIUS RETICULATUS*

4.2. DIVERSIDAD GENÉTICA

4.3. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y ESTRUCTURA DE POBLACIONES

5. DISCUSIÓN

5.1. CONECTIVIDAD DEMOGRÁFICA DE LAS POBLACIONES

5.2. LAS RÍAS GALLEGAS Y EL INCREMENTO DE LA DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de las últimas décadas, muchas investigaciones científicas han tratado de inferir la capacidad de dispersión de las especies marinas y delimitar la escala espacial de la conectividad demográfica de sus poblaciones. El auge de estos trabajos se ha debido, al menos en parte, a sus numerosas aplicaciones prácticas: por ejemplo, definición de *stocks* en pesquerías comerciales (Thorpe et al. 2000, Castillo et al. 2004), control de plagas y especies invasoras (Stæhr et al. 2000, Roman & Palumbi 2004) o diseño de redes de áreas marinas protegidas (Botsford et al. 2003, Palumbi 2003).

La teoría clásica sobre dinámica de poblaciones asumía que las especies marinas estaban menos subdivididas que las continentales (dulceacuícolas o terrestres). Esta visión se basaba en ciertos rasgos de estos organismos y de su hábitat (Caley et al. 1996): (i) el medio marino es homogéneo y carece de barreras a la dispersión; (ii) las especies marinas presentan tamaños poblacionales relativamente grandes; y (iii) muchas de esas especies presentan una fase larvaria que asegura la dispersión. Sin embargo, con la llegada de las técnicas moleculares y su aplicación al estudio de la conectividad entre poblaciones se descubrió que esa supuesta generalidad mostraba numerosas excepciones (Grosberg & Cunningham 2001). Un número creciente de estudios puso de manifiesto que dicho medio aparentemente homogéneo presentaba con frecuencia barreras crípticas de naturaleza diversa que ocasionaban la retención de individuos y el autoreclutamiento: canales de aguas profundas (e.g. Bernardi 2000), cuerpos de agua más o menos aislados (e.g. Perrin et al. 2004), corrientes oceanográficas (e.g. Sotka et al. 2004), afloramientos (e.g. Waters & Roy 2004) o variaciones en distintas condiciones abióticas (e.g. Riginos & Nachman 2001). Alguno de esos estudios llegó incluso a concluir que

las larvas pueden mostrar un comportamiento mucho más activo de lo asumido previamente (e.g. Barber et al. 2002).

Los estuarios son hábitats particularmente interesantes para el estudio de procesos implicados en la conectividad demográfica de poblaciones. Gracias a su relativo aislamiento físico y a sus condiciones ecológicas fluctuantes en espacio y tiempo, en los estuarios interactúan fuerzas evolutivas como la deriva genética y la selección (Bilton et al. 2002). Además, las investigaciones en estuarios poseen un valor intrínseco al tratarse de ecosistemas ecológica, económica y socialmente importantes. Como ocurre con el conjunto más amplio de estudios de dinámica de poblaciones marinas, las investigaciones de la conectividad entre estuarios y costas abiertas adyacentes también se han beneficiado del uso de marcadores moleculares. Los datos disponibles muestran que si bien los estuarios tienden a promover la diferenciación genética a escala poblacional y específica, el patrón de la estructura resultante depende en gran medida del organismo en cuestión, las características hidrográficas locales y la escala espacial considerada (revisado en Bilton et al. 2002). Por tanto, siguen siendo necesarios más estudios que, cubriendo más grupos taxonómicos y más tipos de estuario, aumenten nuestro conocimiento del funcionamiento de estos valiosos ecosistemas.

Las rías, valles fluviales inundados por el mar, constituyen un tipo de estuario presente sólo en algunas regiones costeras del noroeste europeo (Evans & Prego 2003). Pese a que su singularidad es comparable a la de los fiordos escandinavos y neozelandeses, su potencial influencia sobre el flujo genético de las especies ha recibido escasa atención. Ello es particularmente cierto en el caso de la costa atlántica gallega donde, por otra parte, dichos estuarios alcanzan su máxima expresión. De este modo, en el presente trabajo se pretende utilizar el gasterópodo *Nassarius reticulatus* como modelo para estudiar qué efecto pueden tener las rías gallegas sobre la conectividad demográfica de especies con alto potencial de dispersión.

El uso de organismos modelo ha sido recomendado en otros estudios de genética de poblaciones (Palumbi et al. 2003). Dichos organismos se caracterizan por carecer de valor económico o

para la conservación pero, en contrapartida, resultan fáciles de estudiar dada su abundancia. Además, la ausencia de valor económico representa una segunda ventaja pues elimina, al menos en parte, el peligro de que la estructura genética inferida esté influenciada por la acción humana. En este sentido, *Nassarius reticulatus* (L.) es un gasterópodo prosobranquio marino que, no sólo carece de valor económico y para la conservación, sino que presenta otras características que lo convierten en una especie particularmente útil en estudios de genética de poblaciones. Es un organismo común a lo largo de las costas atlánticas europeas, desde los archipiélagos de Canarias y Azores hasta el norte de Noruega; también ha sido registrado en las costas de los mares Mediterráneo y Negro (Fretter & Graham 1985). Por tanto, puede emplearse tanto para estudios regionales como para aquéllos interesados en patrones a escala geográfica más amplia, tanto actuales (e.g. corrientes oceanográficas) como históricos (e.g. glaciaciones). Carroñero obligado, es especialmente abundante en zonas del intermareal con sustrato blando y alto contenido en materia orgánica. Por tanto, es fácil capturar a mano un gran número de individuos sólo con la ayuda de un cebo. Además, su amplia tolerancia a variaciones de salinidad y temperatura (Eriksson & Tallmark 1974) permite mantenerlo en condiciones de laboratorio durante periodos relativamente largos. Finalmente, su ciclo reproductivo y fases larvares se han descrito con detalle. Su ciclo reproductivo muestra un patrón estacional bien definido (Barroso & Moreira 1998) y su capacidad potencial para la dispersión es alta ya que las larvas velíferas que eclosionan de sus cápsulas bénticas forman parte del plancton durante 1-2 meses hasta la metamorfosis (Lebour 1931).

2. OBJETIVOS

La costa atlántica de Galicia se caracteriza por la presencia de cuatro grandes rías que en conjunto reciben el nombre de Rías Baixas. Este tipo de estuarios está también presente en otros puntos del litoral gallego y del atlántico europeo. Sin embargo, en las Rías Baixas probablemente alcanza su máxima expresión. Las Rías Baixas albergan valiosos bancos de pesca y marisco. Además, sostienen una actividad de acuicultura importante (e.g. en su interior hay unas 3300 bateas dedicadas al cultivo de mejillón, Franco Leis 2006). Tal desarrollo económico concentra en sus costas una densidad de población considerable, y todo ello se traduce en una presión obvia en términos de contaminación, sobreexplotación de recursos y destrucción del hábitat. La gestión sostenible de las especies que habitan estos ecosistemas requiere cierto conocimiento de su estructura poblacional. Sin embargo, apenas hay información al respecto.

En el presente trabajo se investiga la estructura genética de 11 poblaciones gallegas del gasterópodo *Nassarius reticulatus* por medio de marcadores RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*). Con los datos obtenidos se pretende:

1. Evaluar la conectividad demográfica de las poblaciones en la región.
2. Investigar si las rías limitan de algún modo el flujo genético entre las poblaciones de su interior y las situadas en la costa abierta adyacente.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ESCALA GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO Y RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

Se recogieron individuos adultos de *Nassarius reticulatus* en 11 localidades de la costa gallega. Dichas localidades cubrieron un rango aproximado de 280 km y se pueden clasificar en dos ambientes marcadamente distintos: 5 situadas en el interior de una misma ría (Ría de Muros), las 6 restantes en áreas de costa abierta (Fig. 1, Tabla 1).

En cada localidad los individuos se capturaron a mano con ayuda de un cebo durante la marea baja. En el laboratorio, se midió la concha (longitud total y longitud de la apertura) y, una vez retirada ésta, se sexaron los animales. En cada muestra, se seleccionaron una veintena de hembras con tamaño situado en torno a la media poblacional que se conservaron (-20 °C) hasta la extracción del ADN (Tabla 1).

Localidad	Código	Tipo	n	L (mm)
Cedeira	CE	Costa abierta	20	22.37
Mera	ME	Costa abierta	20	25.13
Malpica	MA	Costa abierta	20	24.69
Fistera	FI	Costa abierta	20	27.93
Fogareiro	FO	Ría	19	23.62
Abelleira	AB	Ría	20	26.82
Creo	CR	Ría	20	25.98
Batuda	BA	Ría	20	25.05
Pta. Calleira	PC	Ría	20	25.11
O Grove	GR	Costa abierta	20	23.95
A Garda	AG	Costa abierta	20	22.74

Tabla 1.- Escala geográfica del estudio y recogida de las muestras. Nombre y código de las localidades estudiadas, tipo de localidad (costa abierta vs. ría), tamaño muestral (n) y longitud media de la concha de los individuos seleccionados (L).

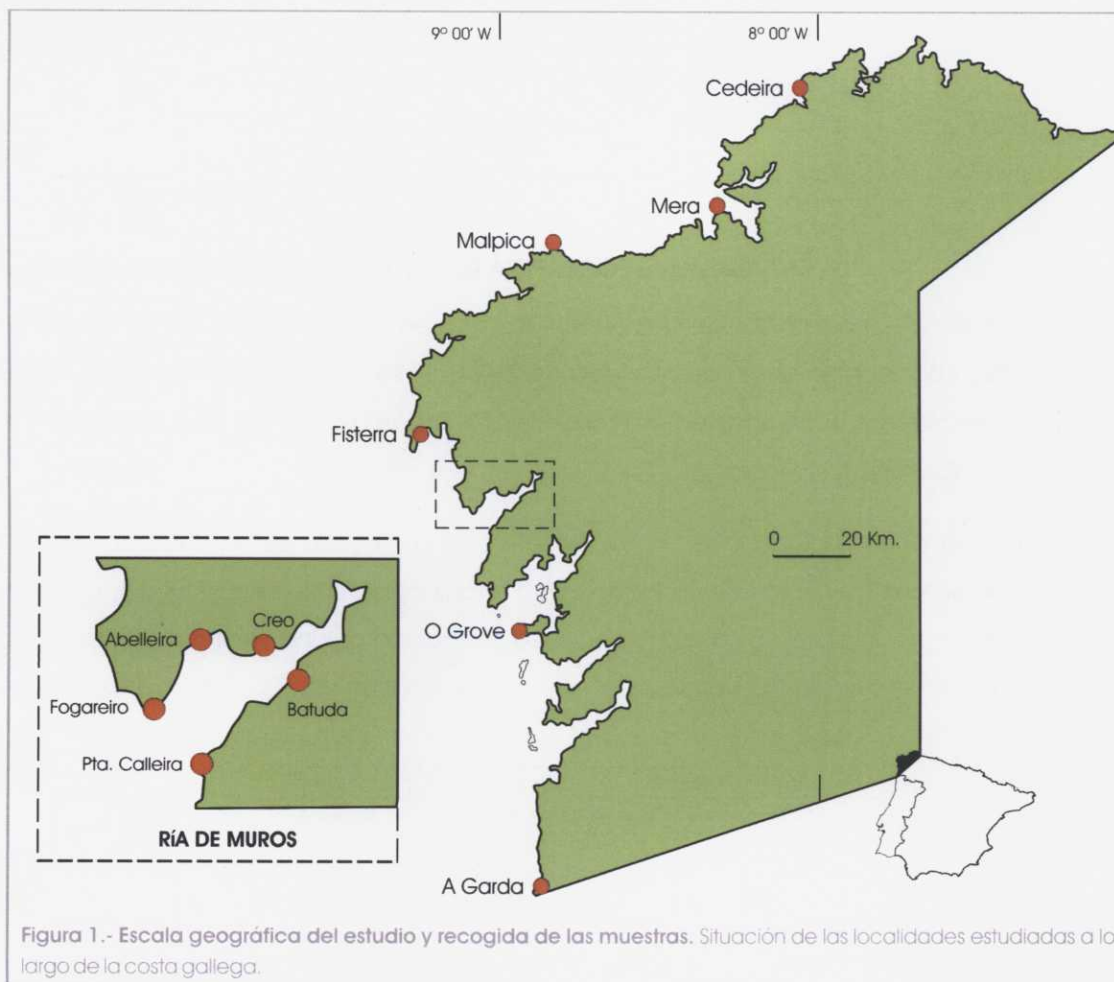


Figura 1.- Escala geográfica del estudio y recogida de las muestras. Situación de las localidades estudiadas a lo largo de la costa gallega.

3.2. EXTRACCIÓN DEL ADN

La extracción del ADN se hizo con el "Wizard Genomic DNA Purification Kit" (Promega, Madison, WI, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Si bien cualquier tipo de tejido puede potencialmente rendir ADN en cantidad y calidad suficientes, se decidió usar el pie del animal pues gónadas y

glándulas digestivas conllevan riesgo de contaminación con ADN de parásitos y microorganismos (Jiang et al. 1997, Kristensen et al. 1999). En resumen, el protocolo seguido fue:

1. Aproximadamente se trocearon 20 mg de tejido del pie y transfirieron a un tubo *Eppendorf* con 500 μ l de *Solución de Lisis de Núcleos* y 120 μ l de EDTA 0.5 M (pH 8.0).
2. Tras añadir 17.5 μ l de Proteinasa K (20 mg/ml), el extracto se incubó toda la noche en baño a 55 °C con agitación suave.
3. Tras la incubación, se añadieron 3 μ l de *Solución ARNasa* y se llevó a cabo una nueva incubación (37 °C, 30 minutos).
4. A continuación, se agregaron 200 μ l de *Solución de Precipitación de Proteínas*. Tras agitar vigorosamente (vórtex, 20 segundos), la muestra se mantuvo en hielo durante 5 minutos.
5. La muestra se centrifugó (16000 g, 4 minutos) precipitando las proteínas.
6. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo que contenía 600 μ l de isopropanol y se mezcló suavemente por inversión hasta que se pudo observar la precipitación del ADN.
7. Tras una nueva centrifugación (16000 g, 1 minuto), el sobrenadante se decantó cuidadosamente y el precipitado de ADN se lavó con 600 μ l de etanol 70%.
8. Tras centrifugar (16000 g, 1 minuto) se retiró el etanol y el precipitado se secó dejando invertido el tubo.
9. Finalmente, se añadieron 100 μ l de *Solución de Rehidratación* y se llevó a cabo una última incubación (65 °C, 1 hora).
10. La concentración de ADN del extracto se cuantificó por espectrofotometría y su integridad se valoró por cromatografía en gel de agarosa (1%). El ADN se almacenó a -20 °C hasta su uso.

3.3. REACCIÓN RAPD

La técnica RAPD, desarrollada independientemente por Welsh & McClelland (1990) y Williams et al. (1990), tiene su fundamento en la metodología estándar de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Su singularidad reside en emplear un único cebador de secuencia arbitraria, de modo que la amplificación tiene lugar cuando existen secuencias diana idénticas, opuestas y relativamente

próximas en ambas cadenas del ADN molde. Una de sus principales ventajas es no necesitar conocimientos previos sobre la biología molecular del organismo objeto de estudio.

Los marcadores RAPD también presentan inconvenientes. Una de las limitaciones más conocidas es la falta de reproductividad de los patrones obtenidos si no se sigue un protocolo rigurosamente estandarizado. Cambios de las condiciones de reacción y/o sus componentes pueden hacer que se amplifiquen productos diferentes. Para minimizar en lo posible ese riesgo, en el presente trabajo se tomó una serie de precauciones:

- Las concentraciones de ADN de todas las muestras se ajustaron individualmente a 10 ng/μl.
- Como mezcla de reacción se utilizó un preparado comercial ("*RAPD Analysis Beads*", Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, EE.UU.) que contiene todos los reactivos necesarios para la reacción RAPD. Los únicos componentes que fue necesario añadir fueron el ADN molde y el cebador. El uso de un preparado comercial reduce los pasos del proceso, incrementa la reproducibilidad técnica y minimiza el riesgo de contaminación. Además, todas las amplificaciones se llevaron a cabo en el mismo termociclador (*PxE Hybaid, Mandel Scientific Company Inc.*, Ontario, Canadá).
- Finalmente, se realizaron tanto controles positivos (con patrón de bandas conocido) como negativos (sin ADN molde).

Otra limitación de la técnica es la dominancia de sus marcadores. En los marcadores RAPD, un polimorfismo puede reflejar bien una delección o un cambio nucleotídico en una de las secuencias diana, bien una inserción de tamaño considerable entre las secuencias diana, o bien una inserción o delección de un fragmento pequeño. Los 3 primeros casos hacen que el marcador correspondiente no se amplifique mientras que el último hace que produzca un marcador de tamaño diferente. Sin embargo, ese último proceso sólo se ha observado en raras ocasiones (Weising et al. 1994). Por tanto, dichos polimorfismos se expresan mayoritariamente como presencia/ausencia del producto amplificado. Como resultado, los marcadores RAPD muestran herencia dominante. La ausencia de una

banda en un *locus* particular indica un individuo homocigoto (genotipo $-/-$) pero su presencia puede denotar tanto un homocigoto ($+/+$) como un heterocigoto ($+/-$). En consecuencia, las frecuencias alélicas sólo pueden estimarse asumiendo equilibrio Hardy–Weinberg. La validez de dicho supuesto no siempre es demostrable. Para esas situaciones existe entonces la alternativa de analizar los datos con aproximaciones que no requieren estimar las frecuencias alélicas (ver más abajo en el apartado de “Análisis de los datos”).

Las reacciones RAPDs (25 μ l) incluyeron la cantidad estándar de “*RAPD Analysis Beads*”, 25 pmol de cebador (5 μ l), 50 ng de ADN molde (5 μ l de concentración 10 ng/ μ l) y 15 μ l de agua desionizada (Milli-Q) estéril. El perfil de la reacción fue 1 ciclo inicial de desnaturalización (5 min, 95 °C); 45 ciclos de 1 min a 95 °C (desnaturalización), 1 min a 36 °C (hibridación) y 2 min a 72 °C (extensión); 1 ciclo final de extensión (5 min, 72 °C).

3.4. ELECTROFORESIS Y VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS

Los productos de la reacción RAPD (8 μ l de la reacción RAPD, 1.5 μ l de azul de carga, y 5 μ l de TBE 1x) se separaron por electroforesis en gel TBE de agarosa (0.7% agarosa con 1% Synergel, *Diversified Biotech*, Boston, MA, EE.UU.) preteñido con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml). La electroforesis (120 V, 2 hr y 45 min) se hizo a 10 °C para minimizar la degradación de los fragmentos de ADN. Además de las muestras, cada gel incluyó 3 pocillos con un marcador de pesos moleculares (*100 base-pair ladder*, *Amersham Pharmacia Biotech Inc.*). Tras la electroforesis, los geles se expusieron a la luz ultravioleta (transiluminador UVT-20 ME, *Herolab*, Wiesloch, Alemania) y se fotografiaron con una cámara digital (*Kodac Digital Science DC40*). Las imágenes se invirtieron y su contraste se realizó con la ayuda de *Corel Photopaint v9.0*. Para facilitar la identificación uniforme de bandas en distintos geles, se prepararon geles mixtos con individuos de todas y cada una de las poblaciones.

3.5. ESTUDIO PILOTO E IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS RAPD

El conjunto de cebadores usados en este trabajo se seleccionó por medio de un estudio piloto. En dicho estudio piloto, se identificó un conjunto de cebadores susceptibles de aportar información útil y reproducible sobre la estructura poblacional de *Nassarius reticulatus* en las costas de Galicia empleando un proceso secuencial en tres pasos:

- En el primer paso, se probaron 40 cebadores (Series A y Q de *Operon Technologies Inc.*, Colonia, Alemania) con 2 individuos de 2 poblaciones distantes entre sí (Cedeira y Fogareiro) para identificar aquéllos capaces de producir productos de amplificación fáciles de puntuar (*i.e.* bandas bien definidas y en número adecuado, ni excesivo ni escaso). Diez de los 40 cebadores probados cumplieron con las condiciones fijadas.
- En el segundo paso, se probaron los 10 cebadores seleccionados en el paso anterior con un número mayor de individuos (5 de cada una de las 2 poblaciones anteriores) para identificar los que generaban polimorfismos informativos. Esta nueva serie de amplificaciones volvió a incluir los 2 individuos utilizados en el primer paso para comprobar la reproducibilidad de los patrones de bandas obtenidos. Un total de 3 cebadores fueron seleccionados.
- Finalmente, se repitió el paso 2 con los 3 cebadores seleccionados para comprobar de nuevo su reproducibilidad.

Para cada cebador, se determinó el tamaño aproximado de los fragmentos amplificados por comparación con el marcador de pesos moleculares en los geles de agarosa. Los fragmentos se puntuaron como presencia/ausencia (1/0). Cada fragmento se nombró combinando el código del cebador y el tamaño del fragmento (*e.g.* OPQ13-323, fragmento de 323 pb amplificado con el cebador OPQ13). Sólo se consideraron fragmentos con claro dimorfismo entre presencia y ausencia en todos los individuos estudiados.

Los marcadores RAPD se comportan de modo dominante. Ello impone limitaciones al análisis de datos pues sólo se puede obtener una estima indirecta de las correspondientes frecuencias alélicas aceptando supuestos como la naturaleza bi-alélica de cada marcador RAPD y que la población está en equilibrio Hardy-Weinberg. Cuando es posible demostrar la pertinencia de esos supuestos (especialmente el equilibrio H-W, por ejemplo usando información independiente para la misma población basada en marcadores codominantes), el análisis de los datos RAPD suele hacerse con aproximaciones estadísticas convencionales basadas en las frecuencias alélicas de cada población. Sin embargo, cuando dichos supuestos no pueden demostrarse, como ocurre en el presente estudio, es más prudente recurrir a aproximaciones alternativas que consideran los patrones RAPD como simples expresiones fenotípicas (i.e. presencia/ausencia de bandas). Esa fue la aproximación predominante en el presente estudio, salvo para facilitar comparaciones con estudios previos en los pocos casos (diversidad genética de Nei) en los que los estadísticos equivalentes para marcadores dominantes (índice de diversidad de Shannon) no suelen usarse con marcadores codominantes.

3.6.1. DIVERSIDAD GENÉTICA

La diversidad genética de cada población se estimó utilizando medidas clásicas basadas en observaciones: (i) número total de bandas y (ii) porcentaje de bandas polimórficas (considerando como tales las presentes en un 99% o menos de los individuos). Ambas estimas pueden verse influidas por el tamaño de muestra y las comparaciones con estudios previos deben hacerse con cautela. También se calculó el índice de diversidad genética de Shannon (Lewontin 1972) como el promedio para todos los *loci* de $H = - \sum p_i \ln(p_i)$, donde p_i es la frecuencia de presencias y ausencias en cada marcador i . Este índice es poco sensible al sesgo introducido con datos dominantes. Para facilitar las comparaciones con estudios basados en marcadores codominantes, también se estimó la diversidad génica no sesgada de Nei (1987) como el promedio para todos los *loci* de $h = (1 - \sum x_i^2) / (2N - 1)$, donde x_i es la frecuencia de cada alelo (1 y 0) en el locus i y N es el tamaño muestral. El valor de di-

cho parámetro en cada población se calculó con el software *Tools for Population Genetic Analysis* (TFPGA v1.3).

3.6.2. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y ESTRUCTURA GEOGRÁFICA

Los análisis de diferenciación genética entre poblaciones se hicieron sólo con los marcadores RAPD polimórficos para todo el conjunto de datos (criterio del 99%) empleando cuatro aproximaciones: Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA), Prueba de Mantel, Análisis de Conglomerados y Escalamiento Multidimensional no Métrico. Además, se investigó la existencia de diferencias significativas entre poblaciones de las frecuencias de los marcadores RAPD utilizando la prueba exacta de diferenciación de poblaciones del software *Tools for Population Genetic Analysis* (TFPGA v1.3), un procedimiento similar a la prueba exacta de Fischer pero que calcula la probabilidad de las diferencias observadas por medio de una aproximación tipo Monte Carlo vía cadena de Markov (1000 pasos de dememorización, 10 lotes, 2000 permutaciones por lote).

3.6.2.1. AMOVA

Wright desarrolló la primera aproximación estadística al análisis de la diferenciación genética de poblaciones a principios de la década de 1950 (Wright 1951). Dicha aproximación se basaba en una idea sencilla: si una población total está subdividida en varias subpoblaciones, la probabilidad de que se crucen dos individuos de la misma subpoblación es mayor que la de que crucen dos individuos de distintas subpoblaciones. Como resultado, una población subdividida presentará una frecuencia de homocigotos mayor de la esperada bajo equilibrio Hardy-Weinberg. En definitiva, Wright propone inferir la existencia de diferenciación cuantificando las desviaciones de las frecuencias alélicas respecto de lo esperado bajo equilibrio Hardy-Weinberg. Para ello, dividió la variación genética en 3 niveles jerárquicos (individuo, subpoblación y población total): (i) H_i : heterocigosidad media observada por individuo, (ii) H_s : heterocigosidad media esperada dentro de las subpoblaciones asumiendo equilibrio Hardy-Weinberg en éstas, y (iii) H_T : heterocigosidad esperada en la población total asumiendo equilibrio

Hardy-Weinberg. Con esas 3 estimas de diversidad genética, Wright elaboró 3 estadísticos para cuantificar la estructura en cada nivel:

- F_{IS} (coeficiente de endogamia). La diferencia entre la heterocigosidad media esperada dentro de las subpoblaciones asumiendo panmixia (i.e. ausencia de estructura) y la observada. $F_{IS} = (H_S - H_I) / H_S$.
- F_{ST} (índice de fijación). La reducción de heterocigosidad dentro de las subpoblaciones respecto de la esperada para la población total como consecuencia de la existencia de estructura. $F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$.
- F_{IT} (coeficiente de endogamia total). La reducción de heterocigosidad de los individuos respecto a la de la población total como consecuencia de cruces no aleatorios en las subpoblaciones (F_{IS}) y existencia de subdivisión poblacional (F_{ST}). $F_{IT} = (H_T - H_I) / H_T$.

Estos 3 estadísticos se conocen como estadísticos F de Wright y se relacionan entre sí del siguiente modo: $1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$. F_{ST} varía entre 0 (no diferenciación) y 1 (diferenciación absoluta), si bien tamaños de muestra desiguales pueden provocar valores ligeramente negativos. F_{IS} y F_{IT} pueden presentar valores positivos o negativos. El primer caso indica un déficit de heterocigotos mientras que el segundo un exceso. La significación estadística de estos valores puede evaluarse por medio de una prueba chi-cuadrado.

En su formulación inicial, Wright consideró un único *locus* dialélico y propuso que en el caso de más de dos alelos se usase el alelo más común y se combinaran las frecuencias de los restantes en un segundo alelo compuesto. Esta limitación fue solventada por Nei (1977) con su estadístico G_{ST} (análogo a F_{ST}) para sistemas multialélicos. Posteriormente, la teoría clásica de Wright sufrió otras modificaciones (e.g. para ampliar el modelo a otros niveles jerárquicos como variación entre poblaciones dentro de regiones). Sin embargo, la modificación más destacable, dada su popularidad, ha sido la propuesta por Weir y Cockerham (1984), que estima la diferenciación de las poblaciones por medio de un análisis de la varianza (ANOVA) de las frecuencias génicas. Este método también estructura de manera jerárquica la diversidad genética entre poblaciones, entre individuos dentro de las poblacio-

nes, y entre alelos dentro de los individuos. Las varianzas de las frecuencias alélicas en cada uno de esos niveles son entonces σ_a^2 , σ_b^2 y σ_c^2 y los estadísticos θ , f y F (equivalentes a F_{ST} , F_{IS} y F_{IT}) se calculan como: $\theta = \sigma_a^2 / \sigma_b^2$; $f = \sigma_b^2 / (\sigma_b^2 + \sigma_c^2)$; $F = (\sigma_a^2 + \sigma_b^2) / \sigma^2$; donde σ^2 es la varianza total de las frecuencias alélicas.

Finalmente, Excoffier et al. propusieron el Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) a principios de la década de 1990 (Excoffier et al. 1992). Este método es similar al propuesto por Weir y Cockerham pues también analiza la estructuración de las poblaciones usando un análisis de la varianza de las frecuencias génicas. Sin embargo, difiere de éste en que AMOVA puede usar información sobre la divergencia evolutiva entre tipos de marcadores moleculares muy diversos (e.g. alelos, haplotipos de restricción o secuencias de ADN) sin que merme la flexibilidad del modelo. De este modo, se puede aplicar el AMOVA a una amplia variedad de datos moleculares sin violar los supuestos inherentes a cada sistema analítico (e.g. no migración, variación generada únicamente por deriva genética, loci independientes). Es más, con AMOVA no es necesario calcular las frecuencias alélicas por lo que este análisis parece especialmente apropiado para datos derivados de marcadores dominantes (Huff et al. 1993, Peakall et al. 1995). El método se basa en calcular una matriz de distancias genéticas entre individuos para, seguidamente, cuantificar el reparto de la varianza de esas distancias dentro y entre grupos predefinidos (e.g. un grupo son los individuos de una misma población). AMOVA genera unos estadísticos Φ , análogos a los estadísticos F , cuyos niveles de significación se calculan por permutación no paramétrica de los datos originales. Ello permite ignorar supuestos habituales en ANOVA (e.g. normalidad, homogeneidad de varianzas).

En el presente estudio, los datos de marcadores RAPD se analizaron con AMOVA usando el *software Arlequin* (Schneider et al. 2000). La matriz de distancias entre todos los posibles pares de individuos se construyó utilizando el cuadrado de la distancia euclídea (número de alelos diferentes entre dos haplotipos RAPD). Se consideraron tres niveles jerárquicos: variación entre grupos de localidades (costa abierta vs. ría), variación entre localidades dentro de los grupos y variación entre individuos dentro de las localidades. Además, se realizaron análisis independientes para cada grupo de localida-

des. La significación de los estadísticos Φ_{CT} , Φ_{SC} y Φ_{ST} se calculó permutando poblaciones dentro de los grupos, haplotipos entre poblaciones dentro de los grupos y haplotipos entre poblaciones y entre grupos respectivamente (10000 permutaciones). Del mismo modo, se calcularon estadísticos Φ_{ST} para todos los pares de poblaciones; en este caso, los valores de significación se corrigieron con el método de Bonferroni para comparaciones múltiples (Sokal & Rohlf 1995).

3.6.2.2. TEST DE MANTEL

Cuando el rango geográfico de una especie es mayor que el potencial de dispersión de sus propágulos, la deriva genética ocasiona divergencia entre poblaciones incluso bajo condiciones de equilibrio (Wright 1943). En estas condiciones, la diferenciación genética entre poblaciones aumentará con la distancia geográfica, de modo que las estimas de diferenciación serán bajas entre pares de poblaciones próximos pero altas para aquéllos más distantes. Este patrón se conoce como aislamiento genético por distancia y la escala espacial a la cuál puede ser observado varía enormemente entre especies. Así, dichas correlaciones positivas entre distancia geográfica y diferenciación genética han sido observadas dentro de una población para grupos de individuos sedentarios, mientras que en especies con elevada movilidad son únicamente evidentes a una escala regional (Lowe et al. 2004).

Un método ampliamente aceptado para evaluar la significación estadística de la correlación entre diferenciación genética y distancia geográfica es el Test de Mantel (Mantel 1967). Dicha correlación es, en definitiva, una regresión donde las variables son las matrices de distancias entre todos los posibles pares de poblaciones. Como los elementos de una matriz de distancias no son independientes, no se puede evaluar la significación estadística de la correlación entre 2 matrices de distancias usando los procedimientos habituales de correlación. En este caso, el test de Mantel resulta más apropiado ya que evalúa la asociación de ambas matrices por un procedimiento de permutación donde filas y columnas se tratan como unidades (se genera una distribución nula del correspondiente estadístico aleatorizando filas y columnas en una de las matrices; la otra se mantiene constante).

En este estudio, el test de Mantel se hizo con el programa *IBD ver. 1.52* (Bohonak 2002). Como matriz de distancias genéticas se usaron los valores Φ_{ST} entre pares de poblaciones, mientras que la matriz de distancias geográficas se estimó tomando la distancia más corta por agua. La relación entre ambas distancias se describió usando regresión tipo Eje Mayor Reducido (RMA, *Reduced Major Axis*). Esta forma de regresión es más adecuada que la aproximación tradicional por mínimos cuadrados (OLS, *Ordinary Least Squares*) cuando la variable independiente se mide con error (Sokal & Rohlf 1995). La regresión se aplicó a las matrices originales y a todas las posibles combinaciones de matrices originales y matrices con valores transformados a escala logarítmica. La significación estadística de las correlaciones se determinó por permutación (10000 permutaciones). Las distancias genéticas negativas o con valor cero se usaron tal cual salvo cuando se transformaron a escala logarítmica que se convirtieron en un valor arbitrariamente bajo (0.0001) antes de la transformación.

3.6.2.3. ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS

El análisis de conglomerados es un procedimiento común para identificar grupos de objetos similares. El proceso de clasificación o agrupación puede hacerse atendiendo a distintos criterios. Por razones obvias, los métodos más utilizados en estudios de genética de poblaciones son los que consideran grupos jerárquicos. Dicho análisis transforma una matriz de distancias entre OTUs (*Operational Taxonomic Units*, e.g. individuos, poblaciones o especies) en una representación gráfica de grupos anidados donde la variabilidad es máxima entre objetos de distintos grupos pero mínima para objetos del mismo grupo.

Hay una amplia variedad de algoritmos para construir conglomerados jerárquicos. Atendiendo al tipo de enlace empleado (i.e. criterio que determina qué grupo debe unirse en cada paso del proceso) es posible distinguir cuatro métodos:

- Enlace simple o vecino más próximo: mide la proximidad entre dos grupos calculando la distancia entre sus objetos más próximos.

- Enlace completo o vecino más alejado: mide la proximidad entre dos grupos calculando la distancia entre sus objetos más lejanos.
- Enlace medio no ponderado: mide la proximidad entre dos grupos calculando la distancia promedio entre todos los posibles pares de objetos que conforman dichos grupos.
- Enlace medio ponderado: como el anterior caso pero aquí puede otorgarse peso distinto a los distintos objetos.

En el presente estudio se llevó a cabo un análisis de conglomerados jerárquicos utilizando el método Enlace Medio no Ponderado, también conocido como Método de Agrupamiento de Pares no Ponderados utilizando la Media Aritmética o UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Means*). Este algoritmo es uno de los más utilizados en este tipo de trabajos pues: (i) es muy rápido (cualquier programa puede construir un árbol con cientos de OTUs en unos pocos segundos) y (ii) reduce el error inherente a las estimas de longitud de los brazos (al representar dichas longitudes distancias medias). El árbol UPGMA se construyó a partir de la matriz de distancias Prevosti entre las 11 poblaciones calculada con el programa *RAPDIST v. 1.0* considerando los patrones RAPD como fenotípicos. El método utilizado para calcular las distancias entre OTUs también es fundamental para la calidad de un dendograma. *RAPDIST v. 1.0* permite estimar 6 medidas diferentes de distancia. Sólo 2 son adecuadas para datos fenotípicos: distancia Arco y distancia de Prevosti (también conocida como distancia de Manhattan). La distancia de Prevosti se eligió por su sencillez y valores más intuitivos. La consistencia del patrón obtenido se valoró calculando 1000 nuevas matrices de distancia por remuestreo aleatorio del conjunto original de datos (*bootstrapping*) con el mismo *software*. Los dendogramas se construyeron con el programa *Neighbor* y el correspondiente árbol consenso se calculó con el programa *Consense*, ambos incluidos en el paquete *Phylip v. 3.62*.

3.6.2.4. ESCALAMIENTO MULTIDIMENSIONAL NO MÉTRICO

Al igual que los procesos de clasificación o agrupación, los procesos de ordenación (dentro de los cuáles se engloba el Escalamiento Multidimensional no Métrico o NMDS) son métodos multivariantes cuyo objetivo es detectar e interpretar patrones en la composición de las muestras. Este análisis representa las relaciones entre muestras de un modo sencillo, al reducir la situación real a un "espacio dimensional bajo". De hecho, el NMDS no es más que una representación de las muestras como puntos en una gráfica de 2, o como mucho 3, dimensiones donde las distancias relativas entre puntos siguen el mismo orden que las diferencias, genéticas en este caso, entre muestras. El ordenamiento NMDS se consigue con un proceso de cálculo iterativo. La bondad del ajuste entre las distancias NMDS y las diferencias genéticas se juzga estimando un coeficiente de estrés. Valores bajos del coeficiente de estrés indican que el NMDS representa de modo fiel las diferencias genéticas.

En el presente estudio, se representó la matriz de distancias genéticas Prevosti generada por *RAPDIST* v. 1.0 usando el algoritmo de cálculo de Escalamiento Multidimensional no Métrico implementado en el paquete estadístico *SYSTAT* v. 10.0. Las poblaciones en el diagrama resultante fueron conectadas por un árbol de expansión mínima o MST (*Minimum Spanning Tree*) estimado con el mismo paquete estadístico.

4. RESULTADOS

4.1. PERFILES RAPD EN *NASSARIUS RETICULATUS*

De los 40 cebadores probados inicialmente, 3 (OPQ-13, OPQ-14 y OPQ-15) originaron patrones de bandas polimórficos y puntuables con relativa facilidad (ver apartado 3.5 del presente capítulo, "Estudio piloto e identificación de productos RAPD"; Fig. 2) y fueron seleccionados para el estudio. Dichos cebadores se caracterizaron también por una reproducibilidad elevada. Los individuos sometidos a repetidas amplificaciones (*i.e.* 2 individuos amplificados 4 veces y 8 individuos amplificados 3) exhibieron en todos los casos patrones de bandas idénticos.

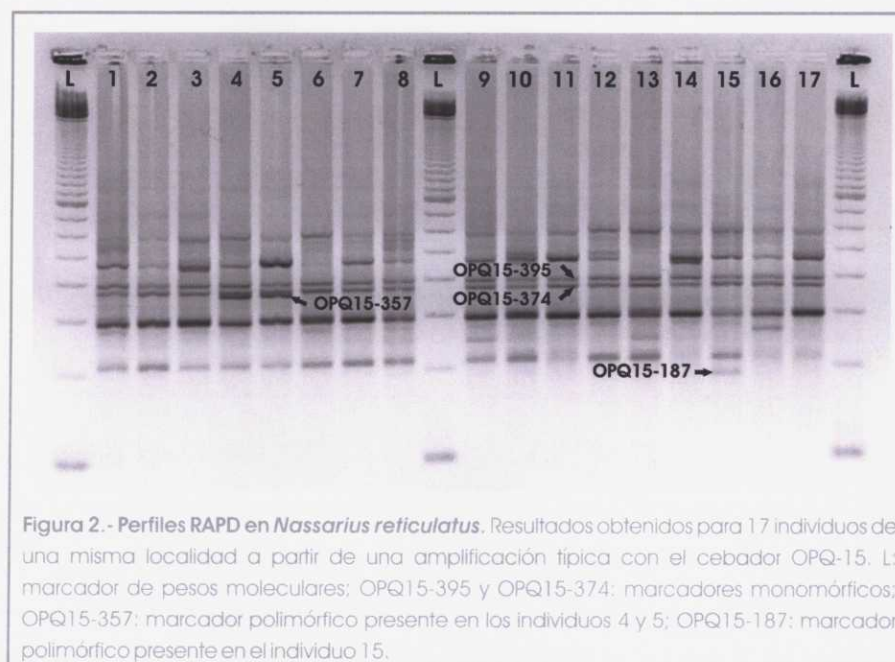


Figura 2.- Perfiles RAPD en *Nassarius reticulatus*. Resultados obtenidos para 17 individuos de una misma localidad a partir de una amplificación típica con el cebador OPQ-15. L: marcador de pesos moleculares; OPQ15-395 y OPQ15-374: marcadores monomórficos; OPQ15-357: marcador polimórfico presente en los individuos 4 y 5; OPQ15-187: marcador polimórfico presente en el individuo 15.

Los controles negativos mostraron amplificación nula en la mayoría de las reacciones. Sólo en raras ocasiones se observó la presencia de unas pocas bandas artefacto que en ningún caso exhibieron el mismo tamaño que los marcadores estudiados. La posibilidad de dichas bandas artefacto es contemplada por los fabricantes de "RAPD Analysis Beads" y ha sido descrita en otros estudios con esta misma técnica (e.g. Haig et al. 1994, Heipel et al. 1998).

Los 3 cebadores seleccionados produjeron un total de 38 marcadores RAPD que pudieron ser puntuados con total confianza; 28 de estos marcadores fueron polimórficos para el conjunto total de datos siguiendo el criterio del 99% (i.e. presencia con frecuencia igual o inferior a 0.99; ver apartado 3.6.1. del presente capítulo). El número medio de bandas por cebador fue 13; el rango de tamaños de las mismas fue de 139 a 1000 bp. El porcentaje de marcadores polimórficos por cebador osciló entre el 69 y el 80% (Tabla 2). Estos 38 marcadores permitieron distinguir 215 fenotipos RAPD en los 219 individuos estudiados. Los fenotipos compartidos se distribuyeron del siguiente modo: (i) 1 individuo de Batuda y 1 individuo de Fogareiro, (ii) 1 individuo de Malpica y 1 individuo de Punta Calleira, y (iii) 1 individuo de Creo, 1 individuo de Fistera y 1 individuo de O Grove.

Cebador	Secuencia	Marcadores		
		Totales	% Polimórficos	Rango (bp)
OPQ-15	5' - [GGAGTGGACA] - 3'	13	69.2	185 - 800
OPQ-14	5' - [GGACGCTTCA] - 3'	15	80	135 - 1000
OPQ-13	5' - [GGGTAACGTG] - 3'	10	70	215 - 580
		38	73.7	135 - 1000

Tabla 2.- Perfiles RAPD en *Nassarius reticulatus*. Código y secuencia de los cebadores analizados, nº de marcadores totales, porcentaje de marcadores polimórficos y rango de tamaños de los productos obtenidos.

4.2. DIVERSIDAD GENÉTICA

Las distintas estimas de diversidad genética no mostraron grandes diferencias entre poblaciones (Tabla 3): (i) el número total de bandas osciló entre 31 (Mera) y 35 (A Garda), (ii) el porcentaje de *loci* polimórficos varió entre el 61% (Mera) y el 68% (O Grove), (iii) el índice de diversidad de Shannon tomó valores entre 0.231 (Batuda y O Grove) y 0.276 (A Garda), y (iv) la diversidad génica esperada osciló

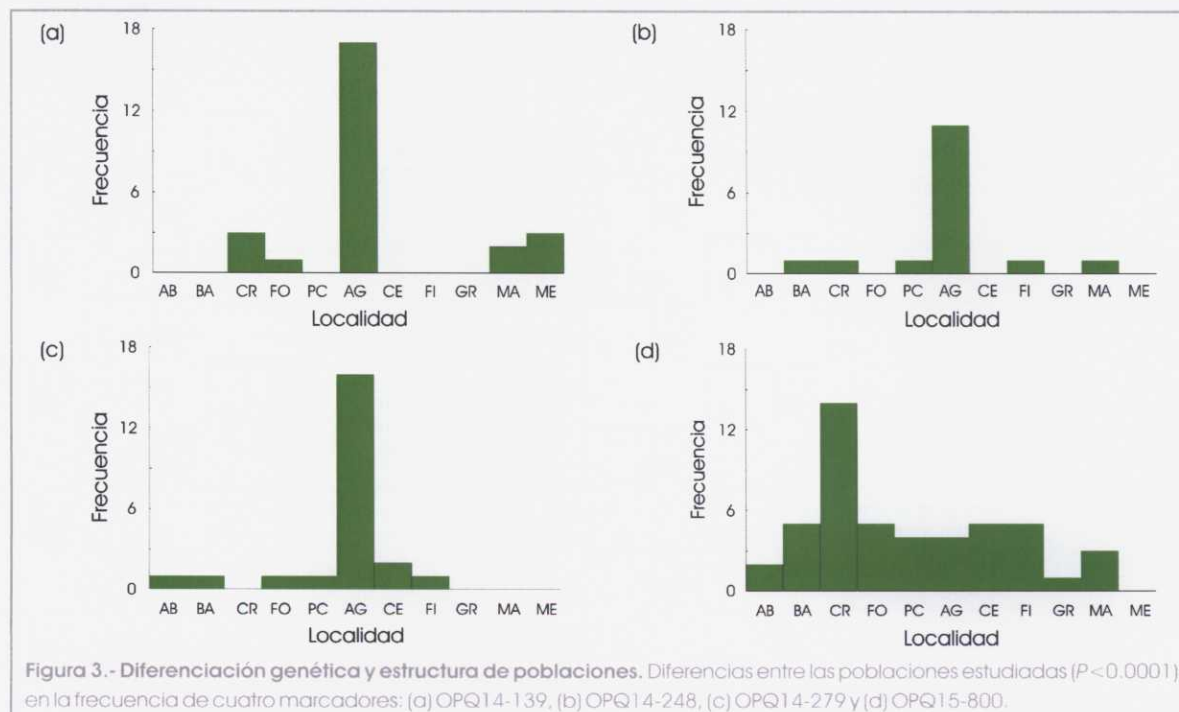
entre 0.140 (O Grove) y 0.176 (A Garda). Ni el índice de Shannon ni la diversidad génica de Nei dieron diferencias significativas de diversidad genética media entre poblaciones (Kruskal-Wallis: $H=2.032$, $P=0.996$ y $H=1.310$, $P=0.999$ respectivamente).

Localidad	n	T	P (% P)	H ₀	h
Abelleira	20	33	22 (67)	0.235	0.150
Batuda	20	32	21 (66)	0.231	0.141
Creo	20	32	21 (66)	0.249	0.157
Fogareiro	19	34	22 (65)	0.255	0.145
Punta Calleira	20	33	22 (67)	0.246	0.145
A Garda	20*	35	23 (66)	0.276	0.176
Cedeira	20	33	22 (67)	0.241	0.149
Fistera	20	33	21 (64)	0.232	0.142
O Grove	20	34	23 (68)	0.231	0.140
Malpica	20	32	21 (66)	0.239	0.154
Mera	20	31	19 (61)	0.243	0.148

Tabla 3.- Diversidad genética. Estimaciones de diversidad genética en 11 poblaciones de *Nassarius reticulatus*. n: tamaño muestral (* denota que n = 19 para el cebador OPQ-13); T: nº total de bandas; P (%P): nº (y porcentaje) de bandas polimórficas; H₀: diversidad de Shannon y h: diversidad génica esperada.

4.3. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y ESTRUCTURA DE POBLACIONES

A pesar de no encontrarse marcadores RAPD específicos de una población (bandas privadas), la probabilidad combinada de los tests exactos de Fisher para los 28 *loci* polimórficos mostró una diferenciación altamente significativa entre las 11 localidades ($\chi^2=150.96$; $P<0.0001$; $gI=56$). Dichos tests exactos detectaron diferencias significativas ($P<0.05$) en las frecuencias de 7 marcadores (OPQ14-139, OPQ14-248, OPQ14-279, OPQ14-800, OPQ15-227, OPQ15-247 y OPQ15-800), si bien sólo 4 (OPQ14-139, OPQ14-248, OPQ14-279 y OPQ15-800) siguieron siendo significativos tras la corrección de Bonferroni. La Figura 3 representa las frecuencias de esos marcadores. Se observa que en 3 de ellos (OPQ14-139, OPQ14-248 y OPQ14-279) la heterogeneidad está causada por la población de A Garda mientras que en el cuarto (OPQ15-800) se debe a Creo.



El AMOVA reveló que casi un 93% de la varianza total era debido a diferencias entre individuos dentro de las poblaciones; las diferencias entre grupos de localidades (costa abierta vs. ría) apenas mostraron relevancia (un 1% de la varianza total) mientras que el 6% restante se debió a diferencias existentes entre poblaciones dentro de los grupos (Tabla 4). El grado de estructuración medio entre los 2 grupos de localidades fue muy bajo ($\Phi_{CT}=0.01213$) aunque significativo ($P=0.021$); el grado de estructuración medio entre localidades dentro de los grupos también mostró un valor bajo estadísticamente significativo ($\Phi_{SC}=0.05935$; $P<0.0001$). Los análisis AMOVA para cada grupo de localidades revelaron que la diferenciación entre poblaciones estaba ocasionada principalmente por las localidades de costa abierta (Tabla 4). Las diferencias entre esas localidades representaron algo menos del 10% de la varianza total y fueron altamente significativas ($\Phi_{ST}=0.09753$; $P<0.0001$), mientras que, las

diferencias entre las 5 poblaciones situadas en el interior de la ría constituyeron menos del 1% de la varianza total y carecieron de significación estadística ($\Phi_{ST}=0.00689$; $P=0.201$).

Fuente de variación	gl	SC	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Estadísticos Φ	P
Entre grupos (costa abierta vs. ría)	1	11.275	0.04009	1.21	$\Phi_{CT} = 0.01213$	0.021
Entre poblaciones dentro de los grupos	9	62.351	0.19373	5.86	$\Phi_{SC} = 0.05935$	<0.0001
Dentro de las poblaciones	208	638.703	3.07069	92.92	$\Phi_{ST} = 0.07076$	<0.0001
Entre poblaciones de costa abierta	5	48.300	0.33021	9.75	$\Phi_{ST} = 0.09753$	<0.0001
Dentro de poblaciones de costa abierta	114	348.350	3.05570	90.25		
Entre poblaciones de ría	4	14.051	0.02142	0.69	$\Phi_{ST} = 0.00689$	0.201
Dentro de poblaciones de ría	94	290.353	3.08886	99.31		

Tabla 4.- Diferenciación genética y estructura de poblaciones. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para 11 poblaciones de *Nassarius reticulatus*. La varianza se dividió en 3 categorías o fuentes de variación: entre grupos, entre poblaciones dentro de los grupos y entre individuos dentro de las poblaciones. Además, en cada grupo se analizó de modo independiente la varianza dentro y entre sus poblaciones. Abreviaturas: gl (grados de libertad), SC (suma de cuadrados), P (probabilidad de obtener por azar una componente más extrema).

Los valores Φ_{ST} entre pares de poblaciones (Tabla 5) muestran que A Garda constituye una entidad genética distinta. Los estadísticos Φ_{ST} entre esta localidad y las restantes poblaciones oscilaron entre 0.1808 y 0.2160, siendo en todos los casos altamente significativos ($P<0.001$). Los valores registrados para Malpica y Mera también sugieren cierta diferenciación de estas localidades, si bien la magnitud de sus estadísticos es menos del 50% de lo registrado para A Garda.

Dada la gran diferenciación entre A Garda y las restantes localidades, se repitieron los AMOVA excluyendo dicha localidad para determinar su influencia sobre la estructura inferida (Tabla 6). Excluir A Garda apenas afectó a las diferencias existentes entre grupos de localidades (1.21% vs. 1.35%) aunque redujo considerablemente la variabilidad entre poblaciones (5.86% vs. 1.86%). De igual modo, cuando únicamente se consideraron las poblaciones de costa abierta, excluir A Garda hizo que las

diferencias entre poblaciones se redujeran en más de la mitad (~10% vs. ~3%), si bien la diferenciación continuó siendo significativa ($\Phi_{ST}=0.03075$, $P=0.0009$).

	AB	BA	CR	FO	PC	AG	CE	FI	GR	MA	ME
AB		0.1871	0.0051	0.5560	0.4649	0.0000	0.1910	0.1527	0.1221	0.0283	0.0057
BA	0.0154		0.1290	0.9977	0.6991	0.0000	0.6337	0.2910	0.1254	0.0001	0.0184
CR	0.0568	0.0205		0.4161	0.0523	0.0000	0.0826	0.1722	0.0025	0.0003	0.0000
FO	-0.0044	-0.0362	0.0014		0.8247	0.0000	0.9884	0.7325	0.3234	0.0178	0.2679
PC	0.0005	-0.0087	0.0299	-0.0153		0.0000	0.3417	0.0993	0.0082	0.0005	0.0165
AG	0.2013	0.2160	0.2071	0.1808	0.2076		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
CE	0.0151	-0.0066	0.0254	-0.0302	0.0060	0.1954		0.8970	0.1126	0.0023	0.0972
FI	0.0178	0.0086	0.0165	-0.0113	0.0214	0.2031	-0.0186		0.3370	0.0197	0.1081
GR	0.0215	0.0205	0.0659	0.0060	0.0494	0.2134	0.0226	0.0060		0.1642	0.0242
MA	0.0371	0.0716	0.0793	0.0409	0.0852	0.1977	0.0573	0.0392	0.0164		0.0002
ME	0.0557	0.0422	0.0824	0.0095	0.0405	0.1918	0.0226	0.0221	0.0430	0.0861	

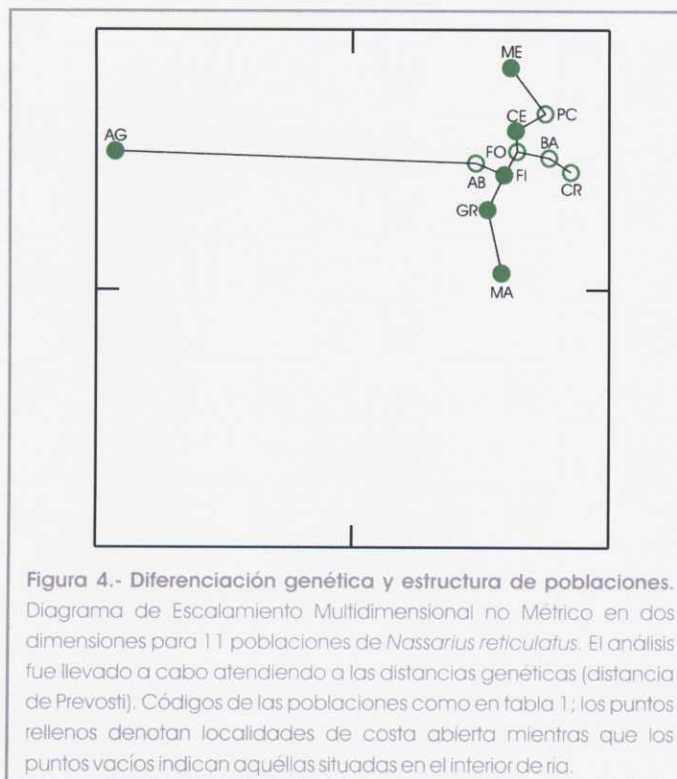
Tabla 5.- Diferenciación genética y estructura de poblaciones. Matriz de valores *pairwise* Φ_{ST} (diagonal inferior) y respectivos *p*-valores (diagonal superior). Los valores en negrita son significativos para un nivel de confianza del 95% tras la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Códigos de las localidades como en la Tabla 1.

Fuente de variación	gl	SC	Componentes	Porcentaje de	Estadísticos Φ	P
Entre grupos (costa abierta vs. ría)	1	8.414	0.04241	1.35	$\Phi_{CT} = 0.01352$	0.016
Entre poblaciones dentro de los grupos	8	33.551	0.05822	1.86	$\Phi_{SC} = 0.01882$	0.003
Dentro de las poblaciones	189	573.703	3.03546	96.79	$\Phi_{ST} = 0.03209$	<0.0001
Entre poblaciones de costa abierta	4	19.500	0.09462	3.07	$\Phi_{ST} = 0.03075$	0.0009
Dentro de poblaciones de costa abierta	95	283.350	2.98263	96.93		

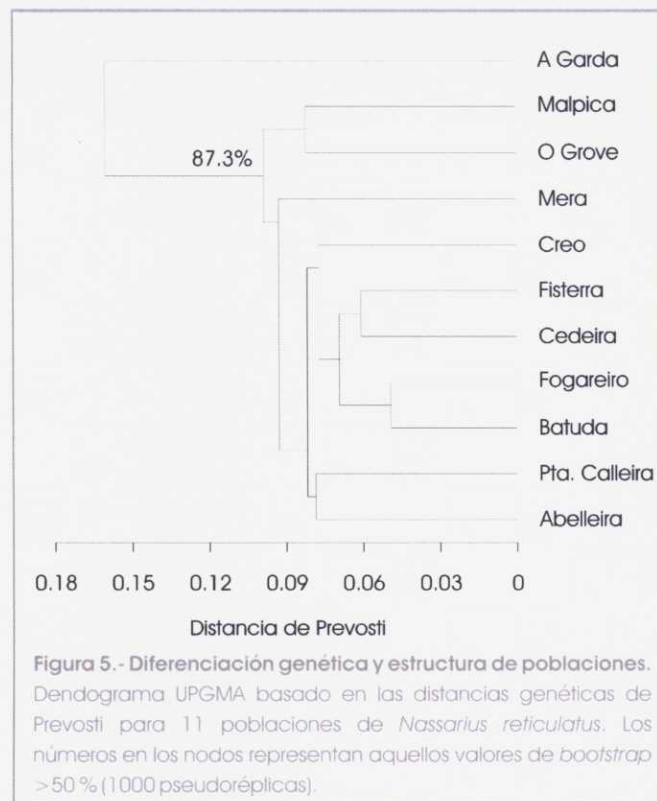
Tabla 6.- Diferenciación genética y estructura de poblaciones. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) tras excluir la localidad de A Garda del conjunto de datos. Abreviaturas: gl (grados de libertad), SC (suma de cuadrados), P (probabilidad de obtener por azar una componente más extrema).

El Escalamiento Multidimensional no Métrico basado en distancias de Prevosti entre poblaciones mostró resultados similares a los expuestos anteriormente (Fig. 4). El coeficiente de estrés de Kruskal (*i.e.* 0.063) indicó que la ordenación en dos dimensiones representaba de un modo fiable las relaciones entre poblaciones. A Garda exhibió una segregación clara mientras que las restantes localidades for-

maron un grupo único. No obstante, es posible inferir también cierta coherencia geográfica en la ordenación de estas 10 localidades. Las poblaciones del interior de ría tendieron a presentar una posición central mientras que algunas localidades de costa abierta (Malpica, Mera y en menor medida O Grove) se vieron desplazadas a los límites verticales del MST.



El análisis de conglomerados UPGMA también mostró resultados coherentes con los anteriores (Fig. 5). La única dicotomía con apoyo estadístico (*bootstrap*) fue la que separa A Garda de las restantes muestras (87%). Las otras localidades formaron un único grupo donde todos los nodos presentaron valores de *bootstrap* inferiores al 50%. De este modo, aunque el análisis sugiere que las localidades de la ría tienden a agruparse juntas, no es posible establecer una relación clara con la distancia geográfica.



La ausencia de un patrón geográfico obvio fue confirmada por el test de Mantel (Fig. 6). Ninguna de las relaciones establecidas entre la matriz de distancias genéticas (valores Φ_{ST}) y la de distancias geográficas recibió apoyo estadístico. Incluso cuando alguna de dichas correlaciones mostró un resultado próximo a la significación estadística (*i.e.* ambas matrices con valores transformados a escala logarítmica, $P \leq 0.054$), la relación entre ambas variables fue muy débil y tan sólo un 15% de las diferencias genéticas pudieron explicarse en base a la distancia geográfica entre poblaciones ($r=0.39$). Las relaciones tampoco mejoraron cuando la localidad de A Garda fue excluida del conjunto de datos (resultados no mostrados).

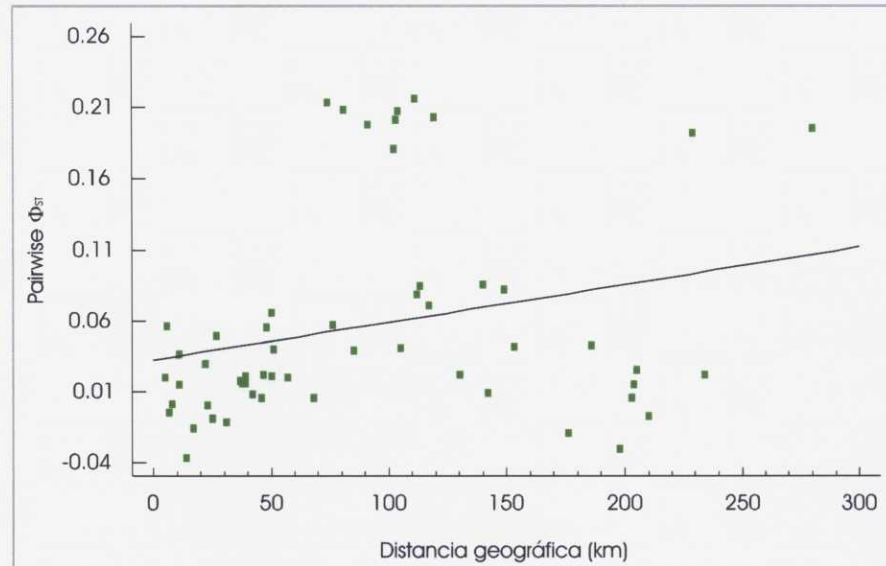


Figura 6.- Diferenciación genética y estructura de poblaciones. Representación gráfica de la asociación entre la matriz de distancias genéticas (estadísticos Φ_{st}) y la matriz de distancias geográficas.

5. DISCUSIÓN

5.1. CONECTIVIDAD DEMOGRÁFICA DE LAS POBLACIONES

Nuestro estudio reveló una divergencia estadísticamente significativa entre poblaciones del gasterópodo *Nassarius reticulatus* distribuidas a lo largo de la fachada atlántica del noroeste de la Península Ibérica. Esta observación resulta en cierto modo inesperada para un organismo cuyo estadio larvario planctónico dura 1-2 meses (Lebour 1931, Tallmark 1980). La relación entre duración de los propágulos y distancia de dispersión establecida para otros invertebrados bentónicos marinos sugiere que periodos larvarios similares deberían traducirse en distancias medias de dispersión que oscilan entre los 30 y los 200 km por año (Shanks et al. 2003), un rango que fácilmente aseguraría la conectividad de las poblaciones estudiadas (donde la distancia máxima no superó los 300 km).

En el caso de otros invertebrados marinos, el hallazgo de niveles de diferenciación genética igual de moderados se ha interpretado como un indicio de flujo genético restringido por retención de larvas cerca de las poblaciones parentales (Heipel et al. 1998, Huang et al. 2000). Dicha retención suele atribuirse tanto a condiciones hidrográficas locales como al comportamiento de las propias larvas. Sin embargo, la idoneidad de tales argumentos en el presente estudio es debatible:

- Determinadas pautas de conducta en las larvas de algunos organismos, como por ejemplo migraciones cíclicas verticales, incrementan la probabilidad de asentamiento cerca de la población de origen, particularmente en el caso de estuarios sometidos a las fluctuaciones de las mareas (Bilton et al. 2002). De igual modo, se sabe que las larvas que pasan su periodo planctónico cerca del fondo se dispersan menos de lo que inicialmente cabría esperar en función de su vida media (Shanks et al. 2003). No obstante, la limitada información disponible para las larvas de *Nassarius reticulatus* proporciona poco soporte a los anteriores mecanismos. Al menos

en la zona de Plymouth, dichas larvas se encuentran restringidas a las capas más superficiales de agua (i.e. 10 m, Fretter & Shale 1973), una observación que si también es aplicable a otras regiones dentro del rango de la especie invalidaría el control de la profundidad como un proceso que limita la dispersión en este organismo.

- La hidrografía costera podría ser una explicación alternativa más prometedora. En la Península Ibérica predominan vientos del norte desde Marzo-Abril hasta Septiembre-Octubre, periodo en el cuál tiene lugar la eclosión y desarrollo de las larvas planctotróficas de *Nassarius reticulatus*. Estos vientos originan una corriente superficial de agua hacia el ecuador (30-40 km de anchura y 50-100 m de profundidad) y un afloramiento a lo largo de la costa (Alvarez-Salgado et al. 2000). En principio, ese escenario debería promover un intercambio de larvas en la región. Sin embargo, pese a que los vientos que predominan son del norte, la dirección de éstos es bastante inestable a corto plazo. El 66% de la variación total en la dirección de dichos vientos se concentra en frecuencias temporales inferiores a los 30 días (Alvarez-Salgado et al. 2003). En consecuencia, el movimiento de las aguas superficiales es mucho más complicado que un simple desplazamiento hacia el sur. De hecho, tanto las medidas directas como los modelos de simulación han mostrado que los cambios del viento pueden generar, en sólo 15 días, entradas y salidas cíclicas de las aguas superficiales entre las rías y la plataforma adyacente. Tal hidrografía cíclica podría limitar la dispersión de las larvas con independencia de su duración en el plancton.

En una interpretación radicalmente diferente, la presencia de niveles bajos de subdivisión entre poblaciones sin patrón geográfico obvio se ha intentado explicar como una consecuencia de variaciones temporales y espaciales en la composición genética de las larvas reclutadas. Éste ha sido el caso en gasterópodos (Johnson & Black 1982), equinodermos (Watts et al. 1990, Moberg & Burton 2000) o balanos (Hedgecock 1986). De acuerdo con esta hipótesis, denominada *Chaotic* (o *Fluctuating*) *Genetic Patchiness* (Johnson & Black 1982), el flujo genético entre poblaciones sería alto pero la reproducción se comportaría como una "lotería" donde el azar determinaría qué adultos se reprodu-

cen con éxito cada año (Hellberg et al. 2002). La variabilidad en el éxito reproductivo podría aumentar con algunos rasgos del ciclo vital de las especies como una esperanza de vida elevada o presencia de larvas con dispersión pasiva (Flowers et al. 2002). Es probable que dicha variabilidad caracterice también a *Nassarius reticulatus*. Los adultos pueden llegar a vivir más de una década (Tallmark 1980) y no se han descrito mecanismos activos para la dispersión de sus larvas. De hecho, varios estudios (algunos de ellos desarrollados en regiones próximas al área de nuestro estudio) han mostrado que en esta especie tanto el reclutamiento como las distintas clases de edad pueden exhibir grandes variaciones de un año para otro (Tallmark 1980, Barroso & Moreira 1998). Tales diferencias en el reclutamiento entre distintos años, junto con cambios temporales en la composición genética de las larvas reclutadas, podrían explicar la variación genética espacial hallada en este estudio, incluso en un escenario de elevado flujo genético. La existencia de diferencias genéticas temporales significativas entre reclutas se ha visto con anterioridad en otros invertebrados marinos (equinodermos en Edmands et al. 1996; bivalvos en Li & Hedgecock 1998; crustáceos en Johnson & Wernham 1999), incluso en zonas costeras con un afloramiento intermitente comparable al que ocurre en el NO peninsular (Moberg & Burton 2000). Sin embargo, no es fácil valorar en qué medida esta teoría es aplicable a nuestros datos. Dicha hipótesis parece haberse atribuido mayoritariamente a especies con mayor capacidad reproductiva que *N. reticulatus* (Hellberg et al. 2002). Por otra parte, si bien cabe esperar que este proceso deje huella en la composición genética de los reclutas recién asentados en la población (Hedgecock 1994), ello difícilmente puede comprobarse con muestras que, como las nuestras, mezclan distintas cohortes. En definitiva, incluso si la hipótesis de *Chaotic Genetic Patchiness* pudiera ser la causa del patrón de variabilidad genética encontrado en el NO de la Península Ibérica, los datos disponibles no permiten aceptar o rechazar tal argumento de un modo concluyente. Ello requeriría un trabajo donde el muestreo fuese diseñado específicamente para estudiar la diferenciación genética entre distintas clases de edad o para comprobar la estabilidad o inestabilidad temporal del patrón de divergencia geográfica en individuos recién reclutados (Moberg & Burton 2000, Lambert et al. 2003).

Las estimas de los estadísticos *pairwise* Φ_{ST} de A Garda presentaron valores inusualmente elevados. Tal diferenciación parece estar provocada principalmente por unos pocos marcadores con frecuencias elevadas en esta localidad. Otros estudios han encontrado resultados similares (*i.e.* elevada diferenciación genética en muestras únicas), interpretándose frecuentemente como poblaciones aisladas en localidades parcialmente confinadas (Heipel et al. 1998, Huang et al. 2000, Uthicke & Benzie 2001). Sin embargo, los individuos de *Nassarius reticulatus* de A Garda se recolectaron en la parte más externa de una pequeña bahía, un lugar bien conectado con mar abierto. Además, si bien esta localidad es la más meridional dentro del rango geográfico estudiado, no parece coincidir con ninguna barrera biogeográfica que pudiera explicar la ruptura genética observada (Avice 1992). En definitiva, con los datos disponibles no resulta posible proporcionar un argumento sencillo que explique la elevada diferenciación genética de esta localidad. Tratándose de una sola observación, no es posible determinar su verdadera relevancia al menos hasta que se vuelvan a encontrar niveles semejantes de divergencia en el mismo lugar o poblaciones vecinas en futuros estudios.

5.2. LAS RÍAS GALLEGAS Y EL INCREMENTO DE LA DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

El presente estudio muestra que las poblaciones de *Nassarius reticulatus* del interior de la Ría de Muros son genéticamente homogéneas. Parece razonable esperar un flujo genético elevado entre dichas localidades teniendo en cuenta las distancias geográficas entre ellas (5-25 km) y su confinamiento en un cuerpo de agua relativamente aislado. Dichas poblaciones pueden por tanto considerarse y gestionarse como una única unidad genética. Sin embargo, no se encontraron evidencias de que estas poblaciones se encuentren particularmente aisladas de las situadas en la costa abierta adyacente. El AMOVA muestra que las diferencias entre grupos de poblaciones (costa abierta vs. ría) son claramente menores que las diferencias entre poblaciones situadas en costa abierta. Es más, los individuos de Fisterra (a 20 km de la boca de la ría de Muros) son genéticamente indistinguibles de los del interior de la ría. En definitiva, el presente trabajo muestra que si bien la Ría de Muros refuerza la homogeneidad de sus poblaciones, ésta no restringe sustancialmente el intercambio genético con las localidades cercanas situadas en costa abierta. Varios estudios han concluido que los estuarios limitan el

flujo genético con las zonas adyacentes. Sin embargo, esa conclusión está lejos de ser universal (Bilton et al. 2002). La falta de consenso no resulta sorprendente. Sobre todo si se tienen en cuenta la amplia variedad de estuarios y organismos que los habitan. Algunos estudios sugieren que los estuarios sí promueven una mayor subdivisión genética en especies con baja capacidad de dispersión (Watts & Johnson 2004). Así mismo, los organismos que se encuentran limitados a la zona más interna de estos ambientes pueden mostrar una mayor tendencia a seguir una estrategia de retención de larvas o mostrar una menor probabilidad de migración fuera del estuario. Por tanto, tenderán a presentar más diferenciación genética que las especies que habitan también la zona más externa (Bilton et al. 2002). Otros estudios han visto que una misma especie puede mostrar patrones de estructura diferentes dependiendo del estuario en cuestión. Por ejemplo, en una revisión de estudios publicados, Watts & Johnson (2004) encontraron que algunos peces australianos mostraban subdivisión de poblaciones entre estuarios y localidades adyacentes en la costa oeste del continente pero no en la costa este. Este hallazgo se relacionó con un mayor flujo y conectividad de los estuarios en esta última región.

La falta de restricciones al flujo genético entre poblaciones de *Nassarius reticulatus* de ría y áreas costeras adyacentes encontrada en nuestro estudio no resulta por tanto sorprendente. No parece probable que las características de la especie incrementen la divergencia entre poblaciones de estuario y poblaciones de costa abierta ya que se trata de un organismo eurihalino y con una capacidad potencial de dispersión elevada. Por otra parte, la hidrografía de las rías gallegas está controlada por afloramientos periódicos que fuerzan un desplazamiento hacia el exterior de sus aguas superficiales. Dicha hidrografía tampoco debería facilitar una limitación al flujo genético. Es más, los tiempos medios de residencia del agua en las Rías Baixas se sitúan por debajo de los 15 días (Alvarez-Salgado et al. 2000), periodos claramente inferiores a la vida media en el plancton de las larvas de este gasterópodo (Lebour 1931, Tallmark 1980).

Los resultados de este estudio reafirman la idea de que el fomento de la diferenciación genética en estuarios no es algo universal. Hacen falta más estudios que contemplen distintas variables biológicas y físicas. De hecho, algunos estudios han apuntado que incluso los fiordos (cuyas característi-

cas hidrográficas parecerían, en principio, facilitar claramente la divergencia de poblaciones) no son capaces de impedir la migración hacia su exterior al menos en especies con desarrollo planctónico y alta capacidad de dispersión (Perrin et al. 2004).

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez-Salgado XA, Figueiras FG, Perez FF, Groom S, Nogueira E, Borges AV, Chou L, Castro CG, Moncoiffe G, Rios AF (2003) The Portugal coastal counter current off NW Spain: new insights on its biogeochemical variability. *Prog Oceanogr* 56: 281-321
- Alvarez-Salgado XA, Gago J, Miguez BM, Gilcoto M, Perez FF (2000) Surface waters of the NW Iberian margin: upwelling on the shelf versus outwelling of upwelled waters from the Rias Baixas. *Est Coast Shelf Sci* 51: 821-837
- Awise JC (1992) Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos* 63: 62-76
- Barber PH, Palumbi SR, Erdmann MV, Moosa MK (2002) Sharp genetic breaks among populations of *Haptosquilla pulchella* (Stomatopoda) indicate limits to larval transport: patterns, causes, and consequences. *Mol Ecol* 11: 659-674
- Barroso CM, Moreira MH (1998) Reproductive cycle of *Nassarius reticulatus* in the Ria de Aveiro, Portugal: implications for imposex studies. *J Mar Biol Ass U K* 78: 1233-1246
- Bernardi G (2000) Barriers to gene flow in *Embiotoca jacksoni*, a marine fish lacking a pelagic larval stage. *Evolution* 54: 226-237
- Bilton DT, Paula J, Bishop JDD (2002) Dispersal, genetic differentiation and speciation in estuarine organisms. *Est Coast Shelf Sci* 55: 937-952
- Bohonak AJ (2002) IBD (Isolation by distance): A program for analysis of isolation by distance. *J Hered* 93: 153-154
- Botsford LW, Micheli F, Hastings A (2003) Principles for the design of marine reserves. *Ecol Appl* 13: S25-S31
- Caley MJ, Carr MH, Hixon MA, Hughes TP, Jones GP, Menge BA (1996) Recruitment and the local dynamics of open marine populations. *Annu Rev Ecol Syst* 27: 477-500
- Castillo AGF, Martinez JL, Garcia-Vazquez E (2004) Fine spatial structure of Atlantic hake (*Merluccius merluccius*) stocks revealed by variation at microsatellite loci. *Mar Biotechnol* 6: 299-306
- Edmands S, Moberg PE, Burton RS (1996) Allozyme and mitochondrial DNA evidence of population subdivision in the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Mar Biol* 126: 443-450
- Eriksson S, Tallmark B (1974) The influence of environmental factors on the diurnal rhythm of the prosobranch gastropod *Nassarius reticulatus* (L.) from a non-tidal area. *Zoon* 2: 135-142
- Evans G, Prego R (2003) Rias, estuaries and incised valleys: is a ria an estuary? *Mar Geol* 196: 171-175

- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 21: 479-491
- Flowers JM, Burton RS, Schroeter SC (2002) The recruitment sweepstakes has many winners: genetic evidence from the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Evolution* 56: 1445-1453
- Franco Leis M (2006) La miticultura en Galicia: una actividad de éxito y con futuro. *Revista Galega de Economía* 15: 1-6
- Fretter V, Graham A (1985) The prosobranch molluscs of Britain and Denmark. Part 8. Neogastropoda. *J Molluscan Stud*: 435-556
- Fretter V, Shale D (1973) Seasonal-changes in population density and vertical distribution of prosobranch veligers in offshore plankton at Plymouth. *J Mar Biol Ass U K* 53: 471-492
- Grosberg R, Cunningham CW (2001) Genetic structure in the sea: from populations to communities. In: Bertness MD, Gaines S, Hay ME (eds) *Marine Community Ecology*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, p 61-84
- Haig SM, Rhymer JM, Heckel DG (1994) Population differentiation in randomly amplified polymorphic DNA of red-cockaded woodpeckers *Picoides borealis*. *Mol Ecol* 3: 581-595
- Hedgecock D (1986) Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? *Bull Mar Sci* 39: 550-567
- Hedgecock D (1994) Does variance in reproductive success limit effective population size of marine organisms? In: Beaumont AR (ed) *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Chapman & Hall, London, p 122-134
- Heipel DA, Bishop JDD, Brand AR, Thorpe JP (1998) Population genetic differentiation of the great scallop *Pecten maximus* in western Britain investigated by randomly amplified polymorphic DNA. *Mar Ecol Prog Ser* 162: 163-171
- Hellberg ME, Burton RS, Neigel JE, Palumbi SR (2002) Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bull Mar Sci* 70: 273-290
- Huang BX, Peakall R, Hanna PJ (2000) Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) populations using RAPD, minisatellite and microsatellite markers. *Mar Biol* 136: 207-216
- Huff DR, Peakall R, Smouse PE (1993) RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *Theor Appl Genet* 86: 927-934
- Jiang L, Wu WL, Lin YS (1997) Efficient methods for isolating mitochondrial DNA from fresh or fixed molluscan specimens. *Zool Stud* 36: 74-78
- Johnson MS, Black R (1982) Chaotic genetic patchiness in an inter-tidal limpet, *Siphonaria* sp. *Mar Biol* 70: 157-164
- Johnson MS, Wernham J (1999) Temporal variation of recruits as a basis of ephemeral genetic heterogeneity in the western rock lobster *Panulirus cygnus*. *Mar Biol* 135: 133-139
- Kristensen TK, Yousif F, Raahauge P (1999) Molecular characterisation of *Biomphalaria* spp in Egypt. *J Molluscan Stud* 65: 133-136

- Lambert WJ, Todd CD, Thorpe JP (2003) Genetic population structure of two intertidal nudibranch molluscs with contrasting larval types: temporal variation and transplant experiments. *Mar Biol* 142: 461-471
- Lebour MV (1931) The larval stages of *Nassarius reticulatus* and *Nassarius incrassatus*. *J Mar Biol Ass UK* 17: 797-818
- Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. *Evol Biol* 6: 381-394
- Li G, Hedgecock D (1998) Genetic heterogeneity, detected by PCR-SSCP, among samples of larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) supports the hypothesis of large variance in reproductive success. *Can J Fish Aquat Sci* 55: 1025-1033
- Lowe A, Harris S, Ashton P (2004) *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*, Blackwell Pub., Malden, MA
- Mantel N (1967) The detection of disease of clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27: 209-220
- Moberg PE, Burton RS (2000) Genetic heterogeneity among adult and recruit red sea urchins, *Strongylocentrotus franciscanus*. *Mar Biol* 136: 773-784
- Nei M (1977) F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann Hum Genet* 41: 225-233
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590
- Palumbi SR (2003) Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecol Appl* 13: S146-S158
- Palumbi SR, Gaines SD, Leslie H, Warner RR (2003) New wave: high-tech tools to help marine reserve research. *Front Ecol Evol* 1: 73-79
- Peakall R, Smouse PE, Huff DR (1995) Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloë dactyloides*. *Mol Ecol* 4: 135-147
- Perrin C, Wing SR, Roy MS (2004) Effects of hydrographic barriers on population genetic structure of the sea star *Coscinaasterias muricata* (Echinodermata, Asteroidea) in the New Zealand fiords. *Mol Ecol* 13: 2183-2195
- Riginos C, Nachman MW (2001) Population subdivision in marine environments: the contributions of biogeography, geographical distance and discontinuous habitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*. *Mol Ecol* 10: 1439-1453
- Roman J, Palumbi SR (2004) A global invader at home: population structure of the green crab, *Carcinus maenas*, in Europe. *Mol Ecol* 13: 2891-2898
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland
- Shanks AL, Grantham BA, Carr MH (2003) Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves. *Ecol Appl* 13: S159-S169
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*, W.H. Freeman and Co., New York

- Sotka EE, Wares JP, Barth JA, Grosberg RK, Palumbi SR (2004) Strong genetic clines and geographical variation in gene flow in the rocky intertidal barnacle *Balanus glandula*. *Mol Ecol* 13: 2143-2156
- Stæhr PA, Pedersen MF, Thomsen MS, Wernberg T, Krause-Jensen D (2000) Invasion of *Sargassum muticum* in Limfjorden (Denmark) and its possible impact on the indigenous macroalgal community. *Mar Ecol Prog Ser* 207: 79-88
- Tallmark B (1980) Population dynamics of *Nassarius reticulatus* (Gastropoda: Prosobranchia) in Gullmar Fjord, Sweden. *Mar Ecol Prog Ser* 3: 51-62
- Thorpe JP, Solé-Cava AM, Watts PC (2000) Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *Hydrobiologia* 420: 165-184
- Uthicke S, Benzie JAH (2001) Restricted gene flow between *Holothuria scabra* (Echinodermata : Holothuroidea) populations along the north-east coast of Australia and the Solomon Islands. *Mar Ecol Prog Ser* 216: 109-117
- Waters JM, Roy MS (2004) Phylogeography of a high-dispersal New Zealand sea-star: does upwelling block gene-flow? *Mol Ecol* 13: 2797-2806
- Watts RJ, Johnson MS (2004) Estuaries, lagoons and enclosed embayments: habitats that enhance population subdivision of inshore fishes. *Mar Freshw Res* 55: 641-651
- Watts RJ, Johnson MS, Black R (1990) Effects of recruitment on genetics patchiness in the urchin *Echinometra mathaei* in Western Australia. *Mar Biol* 105: 145-151
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370
- Weising K, Nybom H, Wolff K, Meyer W (1994) DNA fingerprinting in plants and fungi, CRC Press, Inc., Boca Raton
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354



C 3

A

P

I

T

U

L

O



CAPÍTULO 3: AISLAMIENTO GENÉTICO POR DISTANCIA ENTRE POBLACIONES DE *NASSARIUS RETICULATUS* (L.) A LO LARGO DE LA COSTA ATLÁNTICA EUROPEA¹

1. INTRODUCCIÓN

2. OBJETIVOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ESCALA GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO Y MUESTREO

3.2. EXTRACCIÓN DEL ADN

3.3. AMPLIFICACIÓN POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

3.4. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS

3.5. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS

3.6. ANÁLISIS DE DATOS

3.6.1. DETERMINACIÓN DEL MODELO DE EVOLUCIÓN DEL ADN

3.6.2. ESTIMAS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

3.6.3. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y ESTRUCTURA GEOGRÁFICA

3.6.3.1. ANÁLISIS DE LA VARIANZA MOLECULAR (AMOVA) Y TEST DE MANTEL

3.6.3.2. RED HAPLOTÍPICA

3.6.4. DEMOGRAFÍA HISTÓRICA

¹ Una versión de este capítulo ha sido publicada como: Couceiro L, Barreiro R, Ruiz JM, Sotka EE (2007) Genetic Isolation by Distance among populations of the netted dog whelk *Nassarius reticulatus* (L.) along the european atlantic coastline. J Hered 98:603-610

4. RESULTADOS

- 4.1. ESTABLECIMIENTO DEL CONJUNTO DE DATOS
- 4.2. DIVERSIDAD GENÉTICA
- 4.3. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y ESTRUCTURA GEOGRÁFICA
- 4.4. DEMOGRAFÍA HISTÓRICA

5. DISCUSIÓN

- 5.1. CONECTIVIDAD DE LAS POBLACIONES
- 5.2. DEMOGRAFÍA HISTÓRICA

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, numerosas investigaciones científicas han dedicado un esfuerzo considerable a fin de inferir la capacidad de dispersión de las especies marinas y delimitar a qué escala espacial tiene lugar la conectividad demográfica de sus poblaciones. El auge de estos trabajos es debido, al menos en parte, a sus numerosas aplicaciones prácticas: definición de *stocks* en pesquerías comerciales (Thorpe et al. 2000, Castillo et al. 2004), control de plagas y especies invasoras (Stæhr et al. 2000, Roman & Palumbi 2004) o diseño de redes de áreas marinas protegidas (Botsford et al. 2003, Palumbi 2003).

La visión clásica sobre la estructura de poblaciones asumía que las especies marinas presentaban una subdivisión menor que las especies continentales (dulceacuícolas o terrestres). Esta conjetura se fundamentaba en ciertos rasgos de estos organismos y de su hábitat (Caley et al. 1996): (i) el medio marino es homogéneo y carece de barreras a la dispersión; (ii) las especies marinas presentan tamaños poblacionales relativamente grandes; y (iii) dichas especies suelen poseer una fase larvaria que asegura la dispersión. El advenimiento de las técnicas moleculares y su aplicación al estudio de la conectividad de poblaciones ha revelado que la anterior generalidad muestra numerosas excepciones (Grosberg & Cunningham 2001). Un número creciente de estudios ha puesto de manifiesto que dicho medio aparentemente homogéneo presenta con frecuencia barreras crípticas de naturaleza diversa que ocasionan retención de individuos y autoreclutamiento: canales de aguas profundas (e.g. Bernardi 2000), cuerpos de agua más o menos aislados (e.g. Perrin et al. 2004), corrientes oceanográficas (e.g. Sotka et al. 2004), eventos de afloramiento (e.g. Waters & Roy 2004) o variaciones en distintas condiciones abióticas (e.g. Riginos & Nachman 2001). En algunos estudios incluso llegó a concluir-

se un comportamiento de las larvas mucho más activo de lo asumido previamente (e.g. Barber et al. 2002).

Además, hoy en día está ampliamente aceptado que la estructura genética de muchos organismos no depende sólo de procesos actuales (migración o deriva genética). Muchos estudios han mostrado que eventos históricos como las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno también han tenido una profunda influencia sobre la distribución contemporánea de las especies y sus linajes. La mayoría de esos estudios se han centrado en ecosistemas terrestres mientras que el medio marino sólo ha comenzado a recibir una atención comparable en los últimos años. La información disponible muestra que las glaciaciones han tenido consecuencias distintas a ambos lados del Océano Atlántico Norte. Mientras que se han encontrado algunos patrones concordantes en las faunas del litoral americano (Avice 1992, Wares & Cunningham 2001), tales modelos son aún escasos en el litoral europeo. Tal disparidad entre las costas de ambos continentes podría ser debida a respuestas más complejas de la fauna europea tras el retroceso de las capas de hielo o, alternativamente, una relativa ausencia de estudios en esta área (Jolly et al. 2006).

Dentro del amplio abanico de técnicas moleculares disponibles para cuantificar la estructura de las poblaciones, la secuenciación de fragmentos de ADN mitocondrial constituye una de las opciones más valoradas. Ello es debido a las numerosas ventajas que ofrece (Moritz et al. 1987): (i) en primer lugar, obtener secuencias permite resolver la variabilidad genética con la máxima resolución posible; (ii) ciertas características del ADN mitocondrial, tales como su origen maternal y una tasa de evolución relativamente rápida, hacen que esta molécula sea más adecuada que el ADN nuclear para desvelar diferenciación a nivel poblacional; finalmente, (iii) como dichas secuencias constituyen datos ordenados, es posible estudiar la filogenia intraespecífica e incorporar al análisis de la estructura genética de poblaciones no sólo procesos actuales sino también históricos. Por otra parte, dentro de la molécula de ADN mitocondrial no todas sus regiones han recibido igual atención. Muchos estudios han utilizado secuencias del gen Citocromo c Oxidasa subunidad I (COI). La principal ventaja de este gen es la existencia de un par de cebadores universales y robustos que han sido probados con éxito

en numerosas especies de invertebrados (Folmer et al. 1994). Otros aspectos valiosos de esta región han sido profusamente discutidos por Hebert et al. (2003).

En el presente estudio se utilizan secuencias mitocondriales del gen COI de poblaciones europeas del gasterópodo *Nassarius reticulatus* para investigar su estructura genética e inferir qué procesos actuales e históricos la determinan. Puesto que reunir datos relativos a la estructura genética de poblaciones de todas las especies resulta cuando menos costoso en términos de recursos y tiempo, se ha recomendado emplear organismos modelo en este tipo de trabajos (Palumbi et al. 2003). Dichos organismos se caracterizan por carecer de valor económico o para la conservación pero, en contraposición, son fáciles de estudiar dada su abundancia. Además, la ausencia de valor económico elimina, al menos en parte, el peligro de que la estructura inferida esté influenciada por la acción humana. En este sentido, *Nassarius reticulatus* (L.) es un gasterópodo prosobranquio marino que no sólo carece de valor económico y para la conservación sino que también presenta otras características que lo convierten en una especie particularmente útil en estudios de genética de poblaciones. Es un organismo común a lo largo de las costas atlánticas europeas, desde los archipiélagos de Canarias y Azores hasta el norte de Noruega, también ha sido registrado en las costas de los mares Mediterráneo y Negro (Fretter & Graham 1985). Puede así emplearse en estudios regionales pero también en aquéllos cuya finalidad es revelar patrones que actúan a una escala geográfica relativamente amplia, tanto actuales (e.g. corrientes oceanográficas) como históricos (e.g. glaciaciones). Es especialmente abundante en áreas del intermareal con sustrato blando y contenido elevado en materia orgánica, lo que hace posible capturar a mano un número elevado de individuos, simplemente con la ayuda de un cebo. Además, su amplia tolerancia a variaciones en la salinidad y temperatura (Eriksson & Tallmark 1974) permite mantenerlo en condiciones de laboratorio durante periodos de tiempo relativamente largos. Finalmente, tanto su ciclo reproductivo como sus fases larvarias han sido descritas con detalle: exhibe un ciclo reproductivo con un patrón estacional bien definido (Barroso & Moreira 1998), y su capacidad potencial de dispersión es elevada pues de las cápsulas bénticas eclosionan larvas velígeras que forman parte del plancton durante 1-2 meses hasta la metamorfosis (Lebour 1931).

2. OBJETIVOS

Los estudios de genética de poblaciones que han abarcado una fracción considerable de las costas europeas se han centrado mayoritariamente en especies comerciales o invasoras: *Mytilus* spp. (Sanjuán et al. 1996), *Ostrea edulis* (Launey et al. 2002), *Pecten maximus* (Heipel et al. 1998) *Paracentrotus lividus* (Duran et al. 2004), *Homarus gammarus* (Triantafyllidis et al. 2005), *Buccinum undatum* (Weetman et al. 2006), *Raja clavata* (Chevolot et al. 2006), *Solea solea* (Exadactylos et al. 2003) o *Cyclope neritea* (Simon-Bouhet et al. 2006) entre otros. Las conclusiones de estos trabajos pueden verse afectadas por la actividad humana al interferir ésta en los procesos naturales que gobiernan la estructura de poblaciones de dichas especies. Por ejemplo, el trasvase de individuos con fines comerciales puede llevar a una sobre-estima de las tasas de conectividad entre poblaciones naturales, mientras que la sobre-explotación de algunas poblaciones podría provocar una subestima de la diversidad genética local. Por este motivo, en algunas ocasiones se ha llamado la atención sobre la necesidad de llevar a cabo estudios con especies nativas y carentes de valor comercial (Jolly et al. 2005).

En el presente trabajo se utilizan secuencias mitocondriales del gen COI de poblaciones europeas del gasterópodo *Nassarius reticulatus* para:

1. Investigar la conectividad demográfica de sus poblaciones a lo largo de una escala espacial relativamente amplia (~1700 km).
2. Establecer qué procesos contemporáneos (presencia de barreras y características intrínsecas de la especie) determinan su estructura genética.
3. Inferir la influencia de ciertos eventos históricos sobre la distribución actual de la especie y sus linajes.

Este estudio es el primero en el que se secuencian el genoma mitocondrial de este gasterópodo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ESCALA GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO Y MUESTREO

Para cubrir, en la medida de lo posible, el rango geográfico actualmente aceptado de *Nassarius reticulatus* (Fretter & Graham 1994) se solicitaron muestras de individuos adultos a diversos científicos afiliados a instituciones esparcidas a lo largo de las costas atlánticas y mediterráneas de Europa. Finalmente, en el verano de 2005 se obtuvieron muestras de las 6 localidades resumidas en la Tabla 1 y la Figura 1.

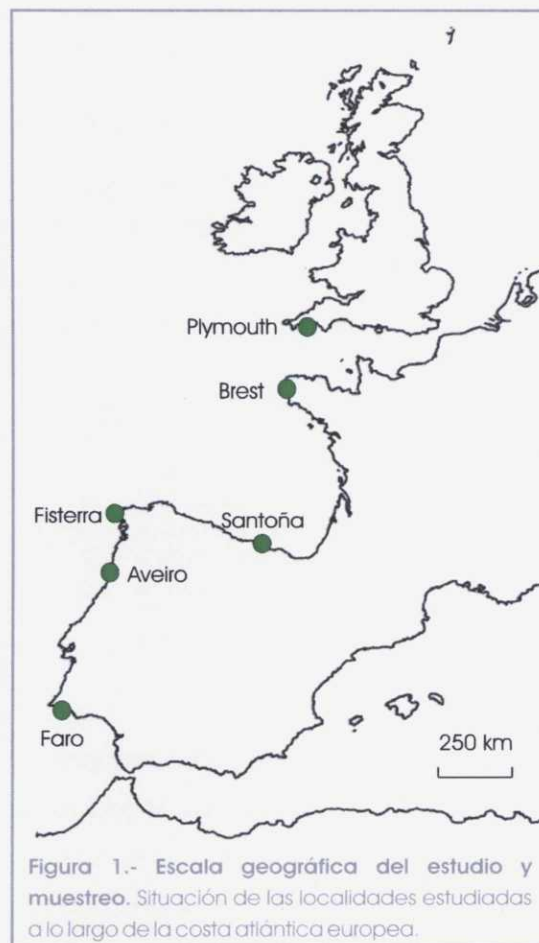
Localidad	Latitud	Longitud	n
Plymouth	50°23'60"N	04°07'00"W	27
Brest	48°23'60"N	04°28'60"W	27
Santoña	43°26'29"N	03°27'27"W	26
Fisteria	42°53'60"N	09°15'00"W	27
Aveiro	40°37'60"N	08°45'00"W	27
Faro	37°01'00"N	07°55'60"W	22

Tabla 1.- Escala geográfica del estudio y muestreo. Coordenadas geográficas y tamaño muestral (n) de las localidades estudiadas.

Los individuos se capturaron a mano o utilizando nasas, siempre con la ayuda de un cebo, y se enviaron vivos al laboratorio en el menor tiempo posible. A su llegada se procedió a su procesamiento y conservación. La concha se rompió con un torno y el animal se extrajo cuidadosamente de su interior. Tras varios lavados en agua destilada para eliminar restos de concha o sedimento, el pie se escindió con un escalpelo estéril y se transfirió a un tubo *eppendorf* autoclavado con etanol 96%. Tras dos semanas, se renovó el etanol de los tubos y las muestras se almacenaron hasta su uso.

Al igual que en nuestro anterior estudio utilizando *Nassarius reticulatus* y marcadores RAPD, se optó por tejido del pie del animal para la extracción del ADN; si bien cualquier tipo de tejido poten-

cialmente rendiría ADN en cantidad y calidad suficientes, gónada y glándulas digestivas conllevan riesgo de contaminación cruzada por parásitos y microorganismos (Jiang et al. 1997, Kristensen et al. 1999).



3.2 EXTRACCIÓN DEL ADN

La extracción del ADN se llevó a cabo utilizando la resina Chelex-100 (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, CA, EE.UU.) (Walsh et al. 1991, Estoup et al. 1996). Este método es un procedimiento muy sencillo, que cuenta con un pequeño número de pasos y no implica múltiples transferencias a nuevos tu-

bos (todo el proceso es llevado a cabo en el mismo). Ello supone un ahorro económico y de tiempo, y minimiza el riesgo de contaminación. Su fundamento reside en la capacidad de las microesferas ionizadas de la resina para quelar iones metálicos polivalentes. En resumen, el procedimiento seguido fue:

1. Una pequeña porción de tejido ($\sim 1 \text{ mm}^3$) se depositó en un tubo *ependorf* al cuál previamente se le habían añadido $120 \mu\text{l}$ de una solución Chelex 10%. El tubo se agitó suavemente y su fondo se golpeó contra una superficie de modo que se arrastró todo el contenido a la parte inferior.
2. La muestra así preparada se incubó a 95°C durante 20 minutos. Cada 10 minutos se golpeó nuevamente el fondo del tubo contra una superficie.
3. Tras la incubación se aplicó un breve vórtex (10 segundos).
4. Finalmente, se centrifugó la muestra a baja velocidad durante 30 segundos.

Los tubos resultantes, que contienen tanto el ADN extraído (sobrenadante) como proteínas desnaturalizadas unidas a la resina, pueden guardarse a 4°C si su uso va a ser inmediato; un almacenamiento más prolongado requiere temperaturas menores (-20°C). En cualquier caso, no debe olvidarse que el ADN se encuentra en condiciones altamente alcalinas (pH 10-11) de modo que su degradación ocurrirá en un periodo de tiempo relativamente rápido. Por último, resulta conveniente llevar a cabo una nueva centrifugación del extracto antes de su uso, asegurando así la ausencia de material distinto al ADN en el sobrenadante.

3.3. AMPLIFICACIÓN POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Inicialmente, se amplificó una región de 710 pares de bases (bp) del gen mitocondrial COI utilizando los cebadores universales descritos por Folmer et al. (1994) (Tabla 2). Los componentes de la mezcla de reacción y concentraciones de los mismos en un volumen final de $25 \mu\text{l}$ fueron: $0.5 \mu\text{M}$ de cada cebador, 0.2 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl_2 , 0.4 U de ADN Taq polimerasa (*Bio-Rad Taq DNA Polymerase*), tampón de PCR 1x (*1x Bio-Rad PCR buffer*, compuesto por 200 mM Tris-HCl, pH 8.4 y

500 mM KCl), 1 μ l de extracto de ADN y agua desionizada (Milli-Q) estéril. El volumen de extracto de ADN a añadir se determinó a partir de una serie de amplificaciones preliminares en las cuáles se ensayaron cantidades que oscilaron entre los 0.5 μ l y los 10 μ l; a raíz de estas experiencias preliminares se comprobó que 1 μ l de extracto producía una amplificación óptima. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *Eppendorf* (Hamburgo, Alemania) y constaron de los siguientes pasos: 1 ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C durante 2 minutos seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C (desnaturalización), 30 segundos a 45 °C (hibridación o *annealing*) y 1 minuto a 72 °C (extensión). Se incluyeron controles negativos (todos los componentes de la reacción exceptuando el extracto de ADN) durante todo el proceso con la finalidad de verificar la calidad de los resultados.

Los productos resultantes de la amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1.5% preparados en tampón TBE 1x. Las condiciones de electroforesis fueron de 100 V durante 20 minutos; concluida ésta, el gel se tiñó por inmersión en una solución de bromuro de etidio (0.5 g/ml), se expuso a la luz ultravioleta en un transiluminador y se fotografió. El tamaño de los productos amplificados se determinó por comparación de las muestras con un marcador de pesos moleculares (*100 base-pair ladder*, *Amersham Pharmacia Biotech Inc.*, Piscataway, NJ, EE.UU.).

La reacción de amplificación resultó exitosa para todas las muestras excepto aquéllas procedentes de la localidad de Plymouth. En consecuencia, se diseñaron un nuevo par de cebadores internos a los descritos por Folmer *et al.* (1994) con la ayuda del programa *Primer3* (Rozen & Skaletsky 2000) (Tabla 2). Las principales variables a tener en cuenta cuando se diseñan nuevos cebadores son:

- Tamaño del oligonucleótido. Cebadores demasiado cortos amplifican productos inespecíficos; un tamaño recomendable oscila entre 18 y 30 nucleótidos.
- Temperatura de fusión (T_m). Una de las variables más importantes y que determina la temperatura de hibridación de la PCR (por regla general, 5-8 °C menor que T_m). Puesto que la reacción de PCR requiere la presencia e hibridación de los dos cebadores, es necesario que las T_m de ambos sean semejantes. El cálculo exacto de T_m requiere una complicada fórmula termodiná-

mica pero una buena aproximación puede conseguirse aplicando la denominada fórmula de Wallace ($T_m = 2 (A+T) + 4(G+C)$).

- Secuencias complementarias. Una homología parcial en las secuencias de los cebadores ocasiona una hibridación ineficiente con el ADN molde (caso de complementariedad en la región central de los mismos) o la formación de dímeros de cebadores (en el caso de complementariedad en sus extremos 3'). Deben por tanto evitarse secuencias complementarias de más de tres bases entre los cebadores. Del mismo modo, deben evitarse secuencias autocomplementarias que dan lugar a estructuras secundarias.
- Contenido G/C. Su importancia en la determinación de T_m ya ha sido expuesta. La temperatura de fusión se incrementa con el contenido G/C de modo que una proporción elevado de estos nucleótidos conlleva una mayor temperatura de hibridación y, en consecuencia, una mayor especificidad entre cebador y molde. Además, temperaturas de hibridación elevadas favorecen ciclos más rápidos. Valores recomendables del contenido G/C oscilan así entre el 45% y el 55%.
- Secuencia 3' terminal. El extremo 3' es determinante en el proceso de hibridación. Residuos de G o C en el extremo 3' favorecen la estabilidad del híbrido cebador-molde debido al mayor número de enlaces hidrógeno (abrazadera GC o GC *clamp*).

Cebador	Secuencia	Tamaño del producto
1490	5'- GGT CTA CTA ATC ACA AAG AYA THG G -3'	710 bp
2198	5'- TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAR AAY CA -3'	710 bp
NasF	5'- AAC AGC TCA CGC TTT CGT AAT -3'	395 bp
NasR	5'- TGC CAA TAC AGG CAA AGA TAA A -3'	395 bp

Tabla 2.- Amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Nombre de los cebadores utilizados, secuencia de los mismos y tamaño del producto obtenido; 1490 y 2198 corresponden a los cebadores universales previamente descritos (Folmer et al. 1994); NasF y NasR son cebadores internos a los anteriores, diseñados en este estudio para la amplificación específica de un fragmento del gen COI en *Nassarius reticulatus*.

3.4. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS

Antes de proceder con la reacción de secuenciación, los productos resultantes de la amplificación deben purificarse eliminándose las cadenas sencillas de ADN (cebadores y productos incompletos) y el exceso de nucleótidos (dNTPs). Un método sencillo para purificar productos de PCR destinados a secuenciación directa es el que utiliza las enzimas *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) y *Exonuclease I* (Exo) (*Amersham Pharmacia Biotech Inc.*). Para purificar un volumen de producto de 5 μ l bastan 0.5 U de SAP y 5 U de Exo. En las anteriores proporciones y a 37 °C durante 30 minutos, estas enzimas digieren las cadenas sencillas de ADN (Exo) y convierten el exceso de dNTPs en dNMPs no reactivos (SAP); a continuación deben eliminarse de la muestra, lo que se consigue elevando la temperatura a 80 °C durante 15 minutos. Este procedimiento se llevó a cabo en el mismo termociclador usado para las reacciones de PCR.

3.5. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS

La secuenciación automática que se lleva a cabo rutinariamente hoy en día está basada en el método enzimático de terminación de cadena propuesto por Sanger et al. (1977). En resumen, dicho método consiste en:

1. El ADN de doble cadena que se desea secuenciar es desnaturalizado.
2. A continuación, un cebador marcado radiactivamente y con secuencia complementaria a un extremo del ADN molde se une a éste.
3. La mezcla constituida por los híbridos ADN molde-cebador se divide en cuatro submuestras y cada una se somete a una reacción de extensión del cebador catalizada por una ADN polimerasa. Todas las mezclas de reacción llevan una elevada concentración de los cuatro deoxinucleótidos necesarios para sintetizar el ADN (dA, dT, dC y dG); además cada una de las mezclas contiene, en menor concentración, un único y distinto dideoxinucleótido (*i.e.* un nucleótido que carece del grupo hidroxilo en el extremo 3').
4. La síntesis de ADN tiene lugar en las reacciones por incorporación de los deoxinucleótidos pero, cuando un dideoxinucleótido es incorporado, la extensión no puede continuar (el nuevo nu-

cleótido no puede unirse a la cadena al carecer la última base de ésta del grupo hidroxilo necesario para el enlace).

5. Como consecuencia, en cada submuestra se producen fragmentos de la molécula de ADN de distintos tamaños marcados radiactivamente; dentro de cada submuestra, la base del extremo 3' es siempre la misma (el correspondiente dideoxinucleótido).
6. Estos fragmentos se separan por electroforesis en un gel de poliacrilamida (cuatro líneas, una por cada submuestra) y se visualizan por autoradiografía.
7. Finalmente, la secuencia de ADN es leída directamente sobre el gel.

Existen dos diferencias básicas entre el método original propuesto por Sanger et al. (1977) y la secuenciación automática actual: (i) el marcaje radioactivo se ha sustituido por fluorescencia; lo habitual es utilizar cuatro fluorocromos distintos, uno por cada dideoxinucleótido; de este modo, ya no resulta necesaria la separación en cuatro submuestras; y (ii) el marcaje por fluorescencia ha permitido que la detección se lleve a cabo al mismo tiempo que la electroforesis, lo que permite analizar un número mayor de nucleótidos pues pueden dejarse escapar del gel los fragmentos de menor tamaño que ya han sido detectados y registrados.

Puesto que en el presente trabajo sólo se contempló secuenciar cada individuo en una sola dirección (*i.e.* *forward* o *reverse*), se realizaron unas pruebas preliminares para determinar cuál de los dos cebadores rendía mejores resultados. Las secuencias fueron en su mayoría buenas para ambos y se decidió continuar el trabajo con el cebador *forward*. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo utilizando el preparado comercial CEQ™ DTCS Quick Start kit (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.) que contiene todos los componentes necesarios para la PCR de secuenciación (dideoxinucleótidos fluorescentes, deoxinucleótidos, ADN polimerasa y tampón de reacción). Las reacciones de secuenciación (20 µl) consistieron en: 4 µl de *Quick Start Mix*, 0.3 µl de cebador, 1 µl de tampón de reacción, 1 µl de ADN molde y 13.7 µl de agua desionizada (Milli-Q) estéril. La reacción se llevó a cabo en el termociclador antes citado con el siguiente perfil: un ciclo inicial de desnaturalización a 96 °C durante 20 segundos seguido de 40 ciclos de 20 segundos a 50 °C (hibridación) y 4 mi-

nutos a 60 °C (extensión). Finalmente, las muestras se precipitaron en etanol (para eliminar los restos de reactivos de la PCR de secuenciación) y se procedió a su lectura en un secuenciador automático Beckman Coulter CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter).

3.6. ANÁLISIS DE DATOS

En una primera aproximación a los datos, los cromatogramas de todas las secuencias se revisaron con el programa ChromasPro (www.techneysium.com) eliminando las secciones de fiabilidad dudosa (i.e. extremos). A continuación, el conjunto total de secuencias se alineó con el software ClustalX (Thompson et al. 1997) utilizando la opción *Alineamiento múltiple* con los parámetros establecidos por defecto.

3.6.1. DETERMINACIÓN DEL MODELO DE EVOLUCIÓN DEL ADN

Dadas dos secuencias nucleotídicas cualesquiera, el modo más simple e intuitivo para calcular la distancia entre ambas es computar el número de diferencias observadas. Sin embargo, puesto que en cada posición existen sólo cuatro posibilidades (A, T, G o C), puede subestimarse esa distancia si alguna o varias de esas posiciones han variado más de una vez. Los denominados modelos de evolución o sustitución del ADN se han desarrollado para corregir ese tipo de errores teniendo en cuenta la existencia de cambios que no pueden observarse directamente. Entre los parámetros más utilizados para definir los distintos modelos de evolución del ADN destacan:

- Probabilidad de cambio entre los distintos nucleótidos. Los modelos más sencillos asumen la misma probabilidad para cualquier tipo de cambio (e.g. *Jukes-Cantor*, Jukes & Cantor 1969), otros establecen diferencias entre transiciones y transversiones (e.g. *Kimura 2-parameters*, Kimura 1980) mientras que los más complejos contemplan hasta seis probabilidades distintas (e.g. *General Reversible Time Model*, Tavaré 1986).
- Frecuencia de cada nucleótido. Dado que para un organismo y gen particular la proporción de los distintos nucleótidos no es siempre la misma (i.e. 0.25), algunos modelos tienen en cuenta esas diferencias.

- Variación en la tasa de sustitución entre regiones de la molécula. Los modelos más sencillos asumen que la tasa de mutación es igual para todas las posiciones nucleotídicas. Esto puede ser un problema en ciertas secuencias donde se ha observado una considerable heterogeneidad dependiendo de la región considerada (e.g. región control del ADN mitocondrial en algunos vertebrados). Algunos modelos tienen en cuenta ese "comportamiento" diferencial entre regiones de la misma molécula (e.g. Modelo de distribución gamma de Tamura-Nei, Tamura & Nei 1993).

En las últimas décadas se han definido numerosos modelos de evolución del ADN, y uno debe enfrentarse al problema de cuál aplicar a su conjunto de datos. Es probable que un incremento en el número de parámetros (i.e. un modelo más complejo) conlleve un mejor ajuste, pero ello no implica que sea ésta la elección más realista. Así, dicha elección no debe fijarse simplemente en que el modelo mejore la probabilidad de los datos sino que, además, debe tener en cuenta que la mejora sea estadísticamente significativa dado el número de parámetros utilizados. Actualmente existen distintos programas capaces de aplicar el anterior criterio de elección llevando a cabo, por ejemplo, pruebas jerárquicas de verosimilitud. El elegido en el caso del presente estudio fue *Modeltest* ver. 3.7 (Posada & Crandall 1998) que permite comparar 56 modelos y aplica dos criterios de elección: pruebas jerárquicas de verosimilitud (hLRT) y criterio de información Akaike (AIC).

3.6.2. ESTIMAS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

La diversidad genética en cada población se caracterizó utilizando medidas clásicas para datos haplotípicos: (i) número de lugares polimórficos o variables (S), (ii) número total de haplotipos (Ht) y (iii) número de haplotipos únicos o haplotipos presentes en un único individuo (Hu). Estas medidas no realizan ninguna asunción acerca de la biología de la especie, si bien es importante tener presente que su valor depende del tamaño muestral.

También se calcularon los índices de diversidad haplotípica (Hd) y nucleotídica (π), así como sus desviaciones típicas, utilizando el programa *DnaSP* ver. 4 (Rozas et al. 2003). El cálculo de la diversi-

dad haplotípica respondió a la fórmula $H_d = 1 - \sum f_i^2$, donde f_i es la frecuencia del haplotipo i -ésimo en la población (Nei 1987), mientras que la diversidad nucleotídica se calculó como el número medio de diferencias nucleotídicas por lugar existente entre dos secuencias (Nei 1987).

3.6.3. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y ESTRUCTURA GEOGRÁFICA

La estructuración geográfica de las poblaciones y su flujo genético se investigaron por los procedimientos habituales en este tipo de estudios: Análisis de la Varianza Molecular o AMOVA (Excoffier et al. 1992) y test de Mantel (Mantel 1967). Además, como las secuencias mitocondriales proporcionan variación ordenada (*i.e.* informativa acerca de las relaciones genealógicas entre muestras), se llevó a cabo una aproximación a la filogeografía intraespecífica por medio de una red haplotípica.

3.6.3.1. ANÁLISIS DE LA VARIANZA MOLECULAR (AMOVA) Y TEST DE MANTEL

El fundamento de estos procedimientos se ha explicado con detalle en el anterior capítulo de la presente memoria. Aquí sólo se puntualiza su aplicación al caso de los datos derivados del presente estudio:

- El Análisis de la Varianza Molecular se llevó a cabo utilizando el *software Arlequin* (Schneider et al. 2000). La matriz de distancias se calculó usando el método de dos parámetros de Kimura (Kimura 1980), identificado por *Modeltest 3.7* como el modelo de sustitución del ADN con mejor ajuste a nuestros datos. El esquema de jerarquías aplicado consideró un único grupo de poblaciones. La significación de los estadísticos Φ se calculó permutando haplotipos entre poblaciones (10000 permutaciones). Del mismo modo, se calcularon estadísticos Φ para todos los posibles pares de poblaciones y sus respectivas probabilidades.
- El test de Mantel se llevó a cabo con el programa *IBD ver. 1.52* (Bohonak 2002). La matriz de distancias genéticas se construyó utilizando los valores Φ_{ST} entre pares de poblaciones mientras que la matriz de distancias geográficas se elaboró tomando siempre la distancia más corta por agua. El método de regresión aplicado fue el denominado Eje Mayor Reducido (RMA, *Reduced Major Axis*), puesto que se ha sugerido que resulta más adecuado que el método tradicional

basado en una aproximación de mínimos cuadrados (OLS, *Ordinary Least Squares*) cuando la variable independiente se mide con error (Sokal & Rohlf 1995). La regresión se aplicó a las matrices originales y, además, a todas las posibles combinaciones de matrices originales y matrices con valores transformados a escala logarítmica. La significación estadística de las correlaciones se determinó con 10000 permutaciones aleatorias.

3.6.3.2. RED HAPLOTÍPICA

Cuando las secuencias de ADN mitocondrial muestran variación intraespecífica, la estructura geográfica de las poblaciones se puede caracterizar utilizando una aproximación genealógica. En primer lugar deben establecerse las relaciones genealógicas entre haplotipos. A continuación, se puede proyectar la distribución geográfica de los haplotipos sobre dicha genealogía para finalmente, inferir el patrón y grado de asociación entre estructura genealógica y geográfica (por ejemplo, si grupos de haplotipos íntimamente relacionados se encuentran de modo consistente en la misma zona geográfica, se puede invocar un flujo genético limitado como la explicación más sencilla).

Las aproximaciones filogenéticas convencionales basadas en modelos interespecíficos no resultan útiles para reconstruir relaciones haplotípicas intraespecíficas pues en éstas últimas es posible la existencia de reticulación, recombinación, multifurcación o persistencia de haplotipos ancestrales. En estos casos, el uso de redes es más apropiado. Éstas no siguen un esquema estrictamente bifurcante permitiendo la incorporación de ciclos y, por tanto, eventos como los antes expuestos. A pesar de constituir un hallazgo relativamente reciente, se han desarrollado numerosos métodos para construir redes haplotípicas (e.g. en base a aproximaciones de distancia, máxima parsimonia o máxima probabilidad) (Cassens et al. 2003).

En el presente estudio, las relaciones genealógicas entre haplotipos se resolvieron construyendo una red haplotípica con el programa *Network 4.1.1.2* (Fluxus Engineering Suffolk, UK). Este software utiliza el algoritmo de estimación de cladogramas *median joining* (MJ) (Bandelt et al. 1999), que combina los principios de envergadura mínima (*minimum spanning*) y máxima parsimonia (*maximum parsimony*).

mony). Como resultado se obtiene una red única donde se incluyen las topologías más parsimoniosas. Dicha red también informa acerca de la frecuencia y localización geográfica de cada haplotipo.

3.6.4. DEMOGRAFÍA HISTÓRICA

Cuando ocurre una expansión dentro del rango geográfico de una especie, las áreas recién colonizadas generalmente portan sólo un subconjunto de los alelos presentes en el área original. En esta situación es posible formular tres sencillas predicciones acerca de su estructura genética:

1. Las áreas recién colonizadas presentarán una diversidad genética menor que el área original (Marko 1998).
2. Los alelos en el área colonizada se encontrarán anillados filogenéticamente dentro de la diversidad de alelos del área original (Templeton 1998).
3. Un crecimiento poblacional elevado es más probable en las áreas recién colonizadas y ello debe ocasionar una huella característica en su genealogía (Rogers & Harpending 1992).

En definitiva, la información relativa a la estructura geográfica de una especie puede también utilizarse para inferir alteraciones demográficas ocurridas en su pasado.

El método más popular y extensamente utilizado en la literatura para inferir la historia demográfica de las especies se basa en la tercera de las anteriores predicciones. Rogers & Harpending (1992) establecieron que la distribución del número observado de diferencias entre pares de haplotipos (*mismatch distribution*) debía seguir un modelo *gaussiano* en poblaciones que han sufrido crecimientos repentinos (reflejando un acúmulo de mutaciones junto con una pérdida mínima de linajes), mientras que dicha distribución debía ser multimodal en poblaciones cuyo tamaño ha permanecido constante durante largo tiempo (consecuencia del acúmulo de mutaciones pero también de una pérdida estocástica de linajes). Estos autores mostraron que la forma de la distribución *mismatch* también informaba acerca de la época y magnitud de la expansión.

En el presente estudio, la historia demográfica de *Nassarius reticulatus* y la posible existencia de alteraciones pasadas en su rango geográfico se investigaron con el *software Arlequin* (Schneider et al.

2000). Este programa estima el ajuste entre la distribución *mismatch* observada y la distribución esperada bajo el modelo de expansión súbita de Rogers & Harpending (1992); la inferencia de parámetros demográficos como el momento de la expansión (τ) se realiza en *Arlequin* de acuerdo con la modificación propuesta por Schneider & Excoffier (1999), i.e. asumiendo un modelo de sitios finitos (*finite-sites model*) y tasas de mutación heterogéneas, lo que resulta en un análisis más realista si se compara con el método original que presupone un modelo de sitios infinitos (*infinite-sites model*).

Una segunda aproximación al estudio de la demografía histórica de *Nassarius reticulatus* se llevó a cabo aplicando el Test D de Tajima también implementado en *Arlequin* (Schneider et al. 2000). Si bien dicho test ha sido utilizado tradicionalmente para medir desviaciones de la teoría neutral (Tajima 1989), también puede aplicarse para valorar la existencia de cambios históricos en el tamaño poblacional. El estadístico D de Tajima mide la diferencia entre el número de diferencias nucleotídicas observado entre dos secuencias tomadas al azar (π) y el número de lugares polimórficos en dichas secuencias (S). Bajo condiciones de equilibrio demográfico, π y S presentan el mismo valor y D es por tanto igual a cero, mientras que desviaciones de dicho equilibrio ocasionan valores D positivos o negativos. Para el caso de una expansión del tamaño poblacional, cabe esperar un exceso de variantes con baja frecuencia o, lo que es lo mismo, un valor negativo de D. La significación del test se valora generando muestras aleatorias (10000) bajo la hipótesis de equilibrio poblacional.

4. RESULTADOS

4.1.- ESTABLECIMIENTO DEL CONJUNTO DE DATOS

Se obtuvieron un total de 156 secuencias a partir de las 6 poblaciones estudiadas. La amplificación con cebadores universales resultó completamente exitosa para 5 de las 6 poblaciones, y el tamaño de los fragmentos obtenidos (utilizando un criterio conservativo, *i.e.* eliminando los extremos de fiabilidad dudosa) se situó en torno a 600 bp. No obstante, en la localidad de Plymouth sólo una decena de individuos amplificaron ese fragmento y para incrementar el tamaño de muestra en esta población se llevaron a cabo las restantes amplificaciones utilizando un par de cebadores internos diseñados específicamente en este estudio. En consecuencia, el tamaño final del fragmento estudiado tuvo que reducirse desde los aproximadamente 600 bp obtenidos con los cebadores universales a los 395 bp obtenidos con los cebadores internos.

Tras el alineamiento, y puesto que no se detectaron fenómenos de inserción y/o delección, la longitud de las secuencias no sufrió alteración alguna. De este modo, todos los cambios observados correspondieron a sustituciones puntuales y, pese a la sustancial reducción en el número de nucleótidos como consecuencia del empleo de cebadores internos, se encontró un polimorfismo elevado: 42 posiciones (10.6%) presentaron variabilidad dando lugar a un total de 43 mutaciones (40 transiciones y 3 transversiones) y 36 haplotipos (números de acceso en la base de datos GenBank: EF571446-80 y EF599762).

De acuerdo con el número observado de transiciones y transversiones, el programa *Modeltest* 3.7 estimó que el modelo de evolución del ADN con mejor ajuste al conjunto de datos era el 2-parámetros de Kimura (Kimura 1980). Este método tiene en cuenta que la probabilidad de que se pro-

duzca una transición (α) es generalmente mayor que la de que ocurra una transversión (β), a pesar de que cada nucleótido tiene dos posibles transversiones pero sólo una posible transición. De este modo, la distancia corregida entre dos secuencias en base a este modelo es igual a $d = [-1/2 \ln(1 - 2P - Q)] - [1/4 \ln(1 - 2Q)]$, donde P y Q son las frecuencias de las posiciones con transiciones y transversiones respectivamente.

4.2.- DIVERSIDAD GENÉTICA

La composición haplotípica de las poblaciones estudiadas se resume en la Tabla 3. Aunque se encontró un número elevado de haplotipos (36), 2 de ellos representaron aproximadamente el 66% de los individuos muestreados mientras que los restantes estuvieron presentes en bajas frecuencias. Así, 26 se hallaron en un único individuo, 4 estuvieron presentes en dos poblaciones (sólo 1 individuo por población), otros 4 se encontraron en tres poblaciones (entre 1 y 4 individuos por población) y, los 2 restantes, los haplotipos dominantes, fueron compartidos por las seis localidades.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	Hu
Plymouth	0.556	0.259	0	0	0	0.037	0	0	0	0.037	0.111
Brest	0.407	0.296	0.037	0	0	0.037	0	0	0.037	0	0.185
Santoña	0.385	0.115	0.077	0.039	0.039	0	0	0	0.039	0	0.308
Fisterra	0.556	0.111	0	0.111	0.037	0.037	0	0	0	0	0.148
Aveiro	0.444	0.185	0	0	0.074	0	0.037	0.037	0	0.037	0.185
Faro	0.455	0.182	0.182	0.046	0	0	0.046	0.046	0	0	0.046

Tabla 3.- **Diversidad genética.** Frecuencias haplotípicas en 6 poblaciones atlánticas de *Nassarius reticulatus*; H1-H10 representa aquellos haplotipos presentes en dos o más poblaciones; Hu es la frecuencia acumulada de los haplotipos encontrados en un único individuo.

La tabla 4 recoge distintas estimas de diversidad genética para cada población: el número total de haplotipos varió entre 14 (Santoña) y 7 (Plymouth y Faro) mientras que el número de haplotipos únicos osciló entre 8 (Santoña) y 1 (Faro). La diversidad haplotípica mostró valores entre 0.849 (± 0.065) en Santoña y 0.641 (± 0.082) en Plymouth. Finalmente, el rango de valores registrado para la diversidad nucleotídica fue de 0.0023 (Plymouth) a 0.0041 (Santoña), lo que supone una divergencia media por par de bases muy inferior al 1%.

Población	S	Ht	Hu	$\pi \times 10^{-2}$ (SD)	Hd (SD)
Plymouth	7	7	3	0.23 (0.05)	0.641 (0.082)
Brest	12	10	5	0.32 (0.06)	0.764 (0.063)
Santoña	16	14	8	0.41 (0.08)	0.849 (0.065)
Fisterra	13	9	4	0.34 (0.12)	0.684 (0.094)
Aveiro	16	11	5	0.38 (0.08)	0.781 (0.073)
Faro	6	7	1	0.25 (0.04)	0.753 (0.075)
Total	42	36	26	0.32 (0.03)	0.743 (0.033)

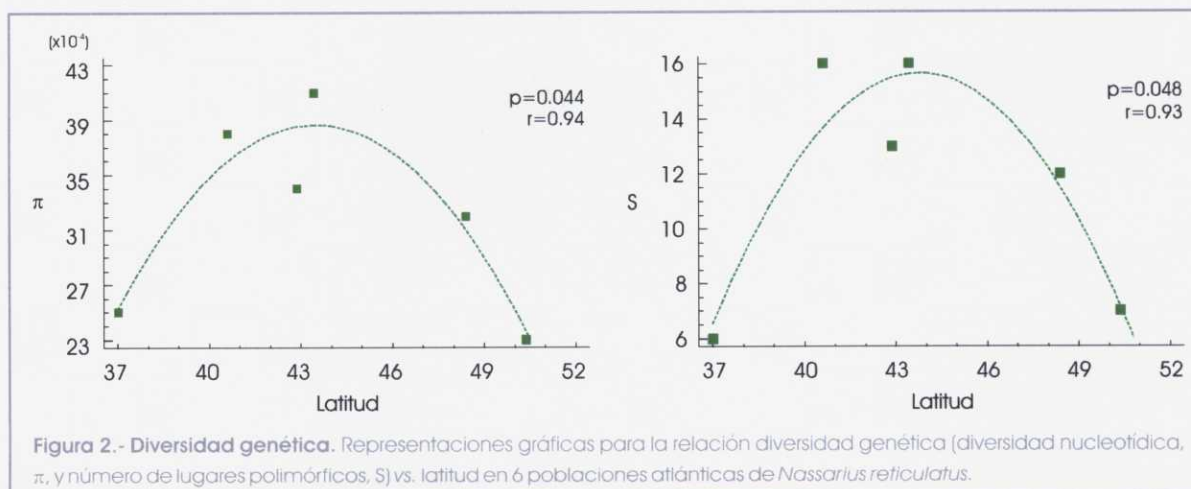
Tabla 4.- **Diversidad genética.** Estimaciones de diversidad genética en 6 poblaciones atlánticas de *Nassarius reticulatus*. S: número de posiciones polimórficas; Ht: número de haplotipos totales; Hu: número de haplotipos únicos; π (desviación típica): diversidad nucleotídica; Hd (desviación típica): diversidad haplotípica.

En los valores de la Tabla 4 parece adivinarse una tendencia a que las localidades situadas en los extremos del rango geográfico estudiado presenten los valores más bajos de diversidad mientras que éstos alcancen sus máximos para latitudes intermedias. Para describir la anterior asociación y valorar su significación estadística se construyeron los correspondientes modelos polinomiales de segundo orden para cada estimador de la diversidad genética (Tabla 5).

Ecuación	Variación	SC	gl	F	P	r
$Ht = -189.167 + 9.168 (\text{lat}) - 0.105 (\text{lat}^2)$	Modelo	22.7692	2	2.72	0.2120	0.80
	Residual	12.5641	3			
$Hu = -180.020 + 8.361 (\text{lat}) - 0.094 (\text{lat}^2)$	Modelo	19.8206	2	3.96	0.1441	0.85
	Residual	7.5128	3			
$Hd = -1.333 + 0.101 (\text{lat}) - 0.0012 (\text{lat}^2)$	Modelo	0.0073	2	0.43	0.6833	0.47
	Residual	0.0253	3			
$\pi = -0.056 + 0.003 (\text{lat}) - 0.00003 (\text{lat}^2)$	Modelo	2.19×10^{-6}	2	10.51	0.0441	0.94
	Residual	3.13×10^{-7}	3			
$S = -362.430 + 17.261 (\text{lat}) - 0.197 (\text{lat}^2)$	Modelo	80.9599	2	9.81	0.0483	0.93
	Residual	12.3735	3			

Tabla 5.- **Diversidad genética.** Relación entre diversidad genética (Ht, Hu, Hd, π y S) y latitud (lat) en 6 poblaciones de *Nassarius reticulatus*. SC (suma de cuadrados), gl (grados de libertad), r (coeficiente de correlación).

Sólo se estimaron valores estadísticamente significativos (i.e. $p < 0.05$) para la diversidad nucleotídica (π) y el número de lugares polimórficos (S). En ambos índices el modelo explicó aproximadamente un 87% de la variabilidad de los datos (Fig.2). El ajuste de las ecuaciones para el número de haplotipos totales (Ht) y el número de haplotipos únicos (Hu) fue pobre ($p < 0.25$), mientras que la correlación diversidad haplotípica vs. latitud reveló los peores resultados con una p próxima a 0.6.



4.3.- DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y ESTRUCTURA GEOGRÁFICA

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) reveló que la práctica totalidad de la variación en los datos estaba ocasionada por las diferencias existentes entre individuos dentro de las poblaciones (99.99%). El índice de fijación medio presentó de este modo un valor muy bajo, estadísticamente no distinto de cero ($\Phi_{ST}=0.00013$, $p=0.4276$; Tabla 6).

Fuente de variación	gl	SC	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	P	Estadísticos Φ
Entre poblaciones	5	3.228	0.00008	0.01	0.4276	$\Phi_{ST} = 0.00013$
Dentro de poblaciones	150	96.507	0.64338	99.99		

Tabla 6.- Diferenciación genética y estructura geográfica. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) en 6 poblaciones atlánticas de *Nassarius reticulatus*; gl (grados de libertad), SC (suma de cuadrados), P (probabilidad de obtener por azar una componente más extrema), Φ_{ST} (índice de fijación análogo a F_{ST}).

Reflejando la ausencia de estructura genética, los estadísticos Φ_{ST} calculados para todos los posibles pares de poblaciones presentaron valores bajos (entre -0.021 y 0.035) no significativos ($p > 0.05$). Sin embargo, un examen más detallado de los mismos mostró que el extremo superior de su rango de valores se correspondía con el par de poblaciones más distantes (i.e. Plymouth - Faro), siendo además dicho valor extremo estadísticamente distinto de cero para un nivel de significación de 0.1 (Tabla 7).

	Faro	Aveiro	Fisteria	Santoña	Brest	Plymouth
Faro	0.991	1.238	1.191	1.290	1.153	0.984
Aveiro	-0.008	1.501	1.413	1.542	1.394	1.208
Fisteria	0.010	-0.014	1.364	1.480	1.346	1.164
Santoña	-0.017	-0.015	-0.011	1.628	1.450	1.277
Brest	0.013	0.002	0.017	-0.004	1.283	1.074
Plymouth	0.035*	0.002	0.023*	0.007	-0.021	0.910

Tabla 7.- Diferenciación genética y estructura geográfica. Estadísticos Φ_{ST} y estimas de divergencia en 6 poblaciones atlánticas de *Nassarius reticulatus*: número medio de diferencias entre poblaciones sobre la diagonal, número medio de diferencias dentro de las poblaciones en la diagonal y estadísticos Φ_{ST} bajo la diagonal.

En concordancia con esa tendencia, el test de Mantel mostró un aislamiento por distancia significativo. La correlación de las matrices de distancias genéticas y geográficas reveló que el modelo explicaba aproximadamente un 37% de la variación de los datos (Tabla 8, Fig. 3). Este patrón significativo no se vio modificado con las posibles transformaciones logarítmicas de las matrices, ni tampoco cuando los valores de diferenciación genética negativos fueron considerados iguales a cero (Tabla 8).

Como última aproximación al análisis de la diferenciación genética de poblaciones, se construyó una red haplotípica donde se representaron las posibles relaciones genealógicas entre haplotipos, así como sus localizaciones geográficas y frecuencias (Fig. 4). Al igual que en el AMOVA, no se observó estructuración geográfica de las poblaciones (i.e. clados privados de haplotipos). Los dos haplotipos con mayor frecuencia difirieron entre sí en una única sustitución y presentaron una posición central dentro de la red; los restantes haplotipos estuvieron, por lo general, íntimamente ligados a los dos an-

teriores (1-2 pasos mutacionales). En consecuencia, el cladograma presentó un patrón típico con forma de estrella.

Matriz 1	Matriz 2	a	b	r	p-valor
DISTGEN	DISTGEO	-0.0324	3.791×10^{-5}	0.6042	0.022
DISTGEN	Log (DISTGEO)	-0.1995	0.06933	0.6146	0.017
Log (DISTGEN)	DISTGEO	-5.170	2.487×10^{-3}	0.5845	0.015
Log (DISTGEN)	Log (DISTGEO)	-16.13	4.548	0.6049	0.008
DISTGEN*	DISTGEO	-0.0148	2.483×10^{-5}	0.5865	0.034
DISTGEN*	Log (DISTGEO)	-0.1243	0.04541	0.5307	0.027

Tabla 8.- Diferenciación genética y estructura geográfica. Regresiones entre las matrices de distancias genéticas (DISTGEN) y las matrices de distancias geográficas (DISTGEO); DISTGEN* indica que los valores Φ_{st} negativos fueron considerados iguales a cero; a y b corresponden a los parámetros de la ecuación $x = a + by$, donde x es la distancia genética e y es la distancia geográfica; r es el coeficiente de correlación; los p-valores se obtuvieron tras 10000 permutaciones aleatorias.

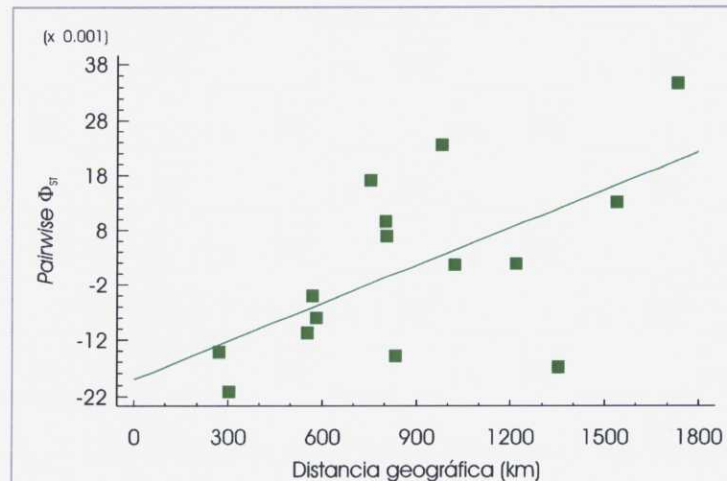
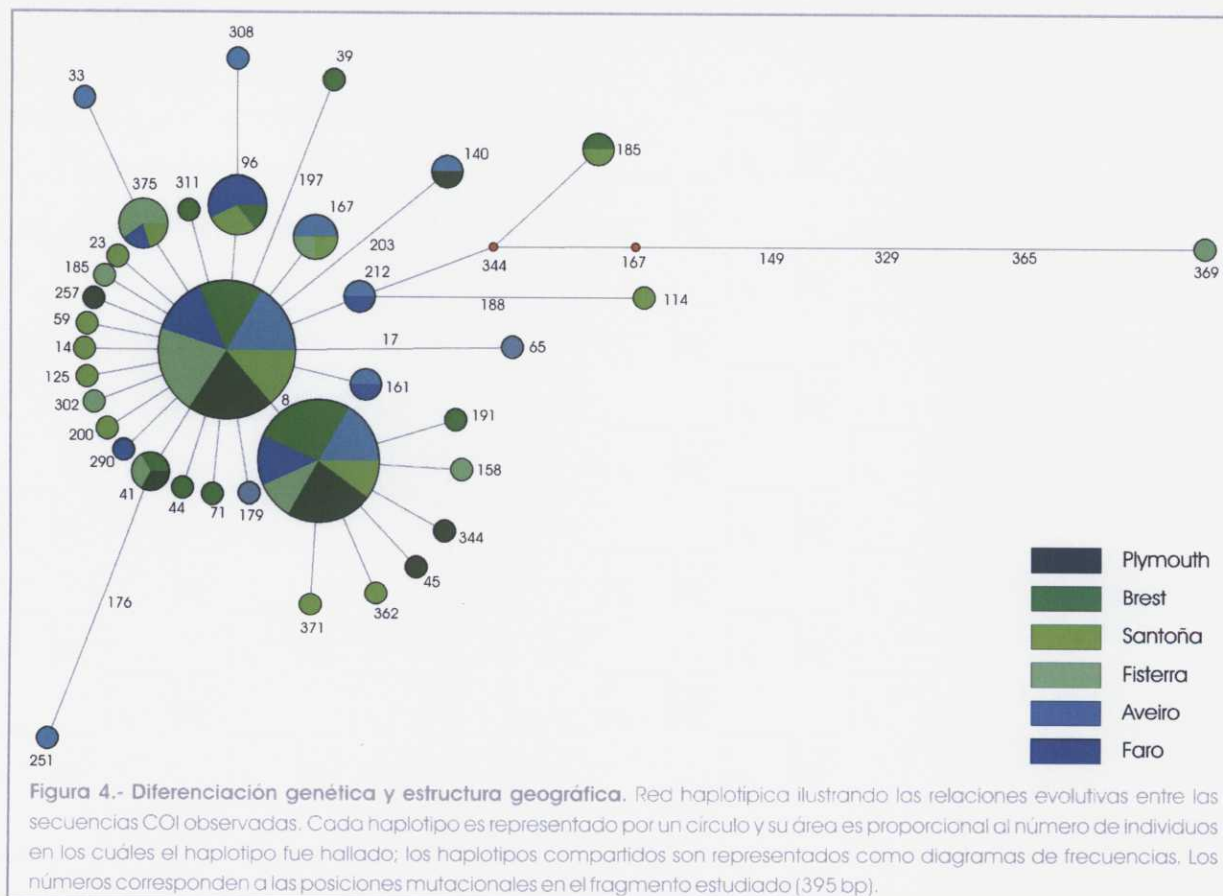


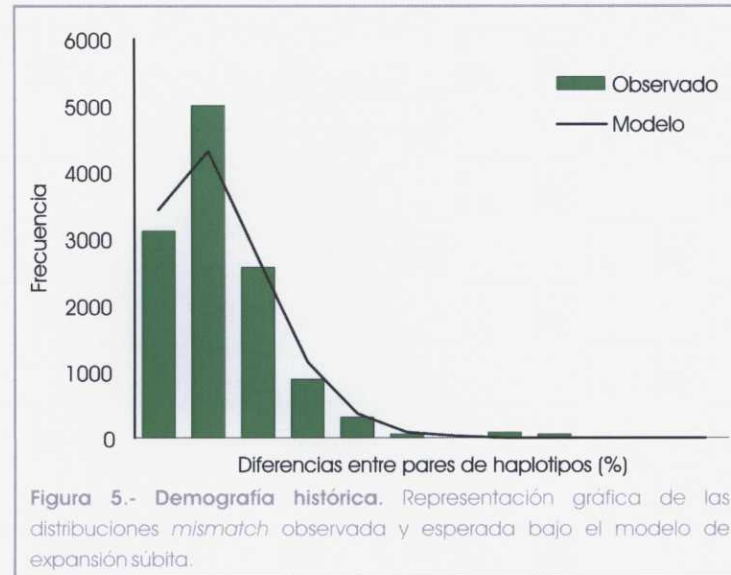
Figura 3.- Diferenciación genética y estructura geográfica. Representación gráfica de la asociación entre la matriz de distancias genéticas (estadísticos *pairwise* Φ_{st}) y la matriz de distancias geográficas.



4.4 DEMOGRAFÍA HISTÓRICA

El ajuste de las distribuciones *mismatch* observada y esperada bajo el modelo de expansión súbita de Rogers & Harpending (1992) fue muy bueno (Fig.5). De acuerdo con el anterior análisis, el estadístico D de Tajima mostró un valor significativamente negativo ($D = -2.48$, $p < 0.001$). Dicho valor negativo puede interpretarse como un exceso de variantes con baja frecuencia, consistente con una expansión del tamaño poblacional. Una tercera evidencia de la existencia de una expansión demográfica en las poblaciones atlánticas de *Nassarius reticulatus* puede encontrarse en el patrón de la

red haplotípica (ver apartado 4.3. y Fig. 4). La red haplotípica presenta forma de estrella que refleja la existencia de un número elevado de haplotipos con bajas frecuencias, consistente con la estima de la D de Tajima.



Puesto que los datos de secuencias COI apuntaban de modo consistente la existencia de una expansión en el rango geográfico, se utilizó la distribución *mismatch* para determinar el tiempo transcurrido desde dicha expansión. Rogers & Harpending (1992) establecieron que la cresta de la distribución *mismatch* (τ) se relaciona con el tiempo transcurrido desde la expansión (T) del siguiente modo: $\tau = 2uT$, donde u es la tasa de mutación del fragmento estudiado. Como no se encontró en la literatura ningún reloj molecular para *Nassarius* u otro gasterópodo íntimamente relacionado, se utilizó para el cómputo del parámetro u una tasa de divergencia de secuencias de 2.4% por millón de años (*i.e.* una tasa de mutación de $1.2 \cdot 10^{-8}$ sustituciones por par de bases y por año) calculada a partir del locus COI de los gasterópodos marinos *Tegula viridula* y *Tegula verrucosa* (Hellberg & Vacquier 1999); de este modo, el valor de u fue establecido en $395 \times 1.2 \cdot 10^{-8} = 4.74 \cdot 10^{-6}$. El valor de τ se obtuvo a partir de *Arlequín* que utiliza para su estimación una aproximación de mínimos cuadrados no lineal

(Schneider & Excoffier 1999); dicho valor fue igual a 1.26. Así pues, la época en la cuál ocurrió la expansión a lo largo de las costas atlánticas fue estimada en hace aproximadamente 133000 años. Aunque los intervalos de confianza para el valor de τ fueron muy amplios (*bootstrapping* con 10000 repeticiones), en todos los casos el límite inferior de T se mantuvo considerablemente alejado del último máximo glacial acontecido hace unos 20000 años (Tabla 9).

IC	τ	T
IC 99%	0.400	42000
	1.607	169500
IC 95%	0.583	61500
	1.515	160000
IC 90%	0.702	74000
	1.465	154500

Tabla 9.- Demografía histórica. Intervalos de confianza (IC) del parámetro τ de la distribución *mismatch* y de las correspondientes estimas del tiempo transcurrido desde la expansión (T, en años).

5. DISCUSIÓN

5.1. CONECTIVIDAD DE LAS POBLACIONES

El desarrollo ontogénico de las especies se considera un factor determinante de la estructura genética de sus poblaciones. Los gasterópodos marinos constituyen un grupo muy útil para cuantificar la importancia relativa de este factor pues exhiben un amplio abanico de posibilidades: desde especies con desarrollo directo hasta otras con larva planctotrófica capaz de sobrevivir en la columna de agua varios meses y, entre ambas, especies con larva lecitotrófica de duración más o menos efímera. Resulta incluso posible encontrar distintos modos de desarrollo entre especies de un mismo género. Varios estudios han comparado la estructura genética de gasterópodos congéneres a lo largo del mismo rango geográfico asumiendo que el modo de desarrollo es la principal diferencia entre ellos (Janson 1987, Hoskin 1997, Kyle & Boulding 2000, Collin 2001). Tanto estos trabajos como los basados en otros grupos taxonómicos han encontrado un buen ajuste entre la conectividad de las poblaciones y el potencial de dispersión de sus propágulos (Bohonak 1999). Los resultados del presente estudio también concuerdan con esa visión general. El análisis de secuencias mitocondriales del gen COI en 6 poblaciones atlánticas del gasterópodo *Nassarius reticulatus*, cuya larva planctotrófica vive hasta dos meses, muestra una estructura poblacional débil y estadísticamente no significativa en una escala geográfica de más de 1700 km. Tres evidencias respaldan esta afirmación: (i) un índice de fijación total Φ_{ST} bajo y no significativo (0.00013); (ii) unos valores de Φ_{ST} entre pares de poblaciones también bajos y no significativos (de -0.021 a 0.035); y (iii) ausencia de asociación entre la distribución de los haplotipos y su localización geográfica. La concordancia entre el presente trabajo y la literatura no es únicamente cualitativa. También concuerda la magnitud de la estructura, ya que los valores del índice de fijación estimados en este estudio son semejantes a los medidos previamente en otros gasteró-

podós marinos utilizando marcadores mitocondriales. Por ejemplo, el estudio de ocho poblaciones de *Littorina scutulata* a lo largo de la costa oeste de Norte América mostró que un 99% de la varianza genética era atribuible a las diferencias entre individuos dentro de las poblaciones (Kyle & Boulding 2000); de igual modo, más del 99% de la varianza genética ocurría dentro de las poblaciones de *Nerita atramentosa* en la costa suroeste de Australia (Waters et al. 2005). Así mismo, también se encontraron niveles de flujo genético elevados en *Littorina brevicula* a lo largo de la costa coreana, un resultado sorprendente dada la subdivisión de dicha costa en cuatro regiones caracterizadas por distintas corrientes oceánicas (Kim et al. 2003).

A pesar de lo anterior, es importante matizar que la existencia de una fase con alto potencial dispersivo en el ciclo de las especies no asegura un flujo genético elevado (ni siquiera moderado) entre sus poblaciones. El espacio físico que ocupan dichas poblaciones puede influir de modo decisivo en su estructura. Así, cada vez hay más ejemplos de especies que, a pesar de presentar un elevado potencial de dispersión, muestran estructuras genéticas significativas como consecuencia de barreras físicas que interrumpen el flujo genético entre sus poblaciones. Tales barreras incluyen, entre otros, corrientes oceanográficas (Wares et al. 2001, Bernal-Ramírez et al. 2003, Star et al. 2003, Sotka et al. 2004), cuerpos de agua más o menos aislados (Pannacciulli et al. 1997, Sköld et al. 2003, Perrin et al. 2004), y canales de aguas profundas (Bentzen et al. 1996). El hallazgo de un flujo genético elevado entre las poblaciones de este trabajo sugiere que esas barreras físicas no están presentes en el área geográfica estudiada. Dicha ausencia de barreras físicas en esta área costera también se ha concluido en estudios previos (Sanjuán et al. 1996, Duran et al. 2004, Triantafyllidis et al. 2005). De hecho, la literatura sugiere que las principales barreras al flujo genético a lo largo de las costas del sur de Europa podrían situarse en el Canal de la Mancha (Luttikhuisen et al. 2003, Roman & Palumbi 2004, Jolly et al. 2005) y el Estrecho de Gibraltar (Sanjuán et al. 1996, Pannacciulli et al. 1997, Roman & Palumbi 2004), límites norte y sur, respectivamente, de este estudio. De este modo, resultaría interesante ampliar el rango geográfico del presente trabajo para cuantificar la importancia relativa de esas barreras para

nuestra especie y la capacidad de organismos con elevado potencial de dispersión como el estudiado por nosotros para sobrepasarlas.

Finalmente, es necesario destacar que la existencia de flujo genético y conectividad entre poblaciones no depende sólo de la dispersión (*i.e.* presencia de una fase con elevada movilidad y ausencia de barreras físicas o, en su defecto, capacidad de dicha fase para superarlas). También requiere la supervivencia de los individuos inmigrantes hasta la reproducción y la contribución con su progenie a las siguientes generaciones. Dentro del rango de una especie, los cambios en las condiciones abióticas (*e.g.* temperatura y salinidad) pueden hacer que el hábitat sólo sea adecuado para poblaciones adaptadas localmente. En estos casos, el flujo genético neto puede ser nulo incluso a pesar de la llegada de individuos inmigrantes, al verse reducida la viabilidad de éstos en la nueva población. Así, un estudio con poblaciones de *Axoclinus nigricaudus* del Golfo de California (un pequeño pez de arrecifes rocosos) reveló una diferenciación genética importante que se relacionó con un cambio abrupto de las características ecológicas del medio (incluyendo temperatura y salinidad). De nuevo en este punto las características de *Nassarius reticulatus* apoyan nuestros resultados. Puesto que este gasterópodo muestra una alta tolerancia al estrés ambiental (Eriksson & Tallmark 1974), su probabilidad de supervivencia tras un evento de dispersión debe ser mayor que la de especies con requerimientos ambientales más severos (*e.g.* Wilke & Davis 2000).

A pesar de la ausencia de una estructura genética total significativa, el análisis de la relación entre el aislamiento genético y la distancia geográfica mostró una sorprendente relación positiva significativa. Dicha relación sugeriría que el flujo genético entre las poblaciones se encontraría de algún modo restringido y que no puede aceptarse la idea de una panmixia absoluta. La discrepancia entre ambos análisis (*i.e.* estadísticos Φ_{ST} frente a la asociación diferenciación genética y distancia geográfica) podría estar relacionada con su robustez estadística. Tal y como demostró Waples (1998), no es posible distinguir con fiabilidad estadística una diferenciación genética total muy pequeña (*e.g.* del orden del 1%, como la estimada en nuestro estudio) del ruido de fondo inherente a este tipo de estimas. En tales casos, se ha sugerido que precisamente el uso de una aproximación basada en el aná-

lisis del aislamiento por distancia (nuestra segunda aproximación en el análisis de datos anterior) puede proporcionar un mayor poder estadístico (Palumbi et al. 2003). Además, también se ha sugerido que dicho análisis podría facilitar un marco ecológico más adecuado para interpretar la distancia de dispersión de las especies en una escala de tiempo ecológica frente al método tradicionalmente empleado para inferir el flujo genético (i.e. Nm o número de migrantes por generación) (Palumbi 2003). Por medio de simulaciones del modelo de dispersión propuesto por Palumbi (2003), Kinlan & Gaines (2003) estimaron una función altamente robusta que relaciona la distancia media de dispersión (d) con la pendiente de dicha relación (p): $d=0.0016(p)^{-1.0001}$. De acuerdo con esa función, los datos recogidos en nuestro trabajo sugieren una distancia media de dispersión para las larvas de *Nassarius reticulatus* de 70 km (este valor no mostró una variación considerable cuando la pendiente se recalculó considerando los valores Φ_{ST} negativos iguales a cero: 110 km). Dicha estima parece razonable por varios motivos:

- Es coherente con las estimas obtenidas por métodos directos (i.e. observaciones de la distribución espacial de las larvas, observaciones de frentes de invasión o estimas experimentales de dispersión). El valor inferido para larvas velígeras planctotróficas de *Littorina littorea*, con una vida en el plancton de aproximadamente un mes, es de 42 ± 40 km. También se obtienen valores semejantes en otros grupos taxonómicos con duración larvaria similar (e.g. 33-130 km para las larvas del pez *Lutjanus kasmira* que duran 25-47 días, 63 km para las de *Carcinus maenas* con una duración de 80 días) (recopilado en Shanks et al. 2003)
- El valor obtenido en el presente estudio también es coherente con las estimas indirectas obtenidas por Kinlan & Gaines (2003) para un amplio rango de invertebrados marinos utilizando el mismo método. Estos autores revisaron numerosos trabajos publicados con patrones de aislamiento por distancia significativos estimando las distancias medias de dispersión en base a la pendiente de dicha relación. En el caso de gasterópodos, obtuvieron valores entre ~ 0.5 km y 16 km para especies con desarrollo directo mientras que dicho rango se situaba entre ~ 20 km y 140 km para especies con larvas con capacidad de dispersión.

- Una dispersión media de ~ 70 km es coherente con los resultados obtenidos para la especie utilizando marcadores RAPDs a lo largo de la costa gallega (NO Península Ibérica). En este trabajo no se obtuvo ningún patrón geográfico obvio a lo largo de 300 km (Capítulo anterior de la presente memoria, Barreiro et al. 2006).

Una relación significativa entre diferenciación genética y distancia geográfica es el resultado de un equilibrio entre deriva genética y migración. Tanto eventos históricos como cambios temporales en la magnitud del flujo genético pueden alterar y/o invalidar esa relación. En el presente estudio, el tiempo transcurrido desde la supuesta expansión demográfica (decenas a centenas de miles de años, apartado 4.4.) sugiere que dicha pendiente debería encontrarse en equilibrio: parece entonces improbable que el anterior análisis sobre la capacidad de dispersión esté afectado por dicha expansión.

5.2. DEMOGRAFÍA HISTÓRICA

El rango geográfico de muchos organismos sufrió repetidas fluctuaciones de considerable magnitud durante los ciclos climáticos del Pleistoceno. El estudio del registro fósil ha proporcionado evidencias directas de dichas fluctuaciones observándose que, por lo general, guardaron una relación con la latitud. Dado que las condiciones climáticas del planeta han permanecido relativamente constantes desde el final del Pleistoceno, la distribución actual de muchas especies y sus linajes debe reflejar los procesos acontecidos tras su última glaciación (con máximo hace ~ 20000 años). Esto es, expansiones demográficas hacia el norte acompañando el retroceso de las capas de hielo y, en consecuencia, descenso de la diversidad genética con el incremento de la latitud (Hewitt 2000, Hewitt 2004). Con el advenimiento de las técnicas de secuenciación de ADN y el desarrollo del campo de la filogeografía, el número de estudios acerca de la impronta de tales procesos históricos sobre la distribución actual de las especies se ha incrementado exponencialmente, proporcionando buenos ejemplos del cumplimiento de las anteriores predicciones (revisado en Hewitt 1999, Hewitt 2000, Hewitt 2004).

En el presente estudio, las secuencias del gen COI también revelaron información sobre la historia de las poblaciones de *Nassarius reticulatus*. La existencia de una expansión demográfica es apoyada por tres evidencias: (i) el ajuste entre la distribución *mismatch* observada y esperada bajo el modelo de expansión súbita (Rogers & Harpending 1992); (ii) un valor significativamente negativo del estadístico D de Tajima; y (iii) una red haplotípica en forma de estrella. Resultados similares en estudios previos, realizados con una amplia variedad de organismos y regiones geográficas, también se han interpretado como la huella genética de una expansión poblacional histórica (e.g. Uthicke & Benzie 2003, e.g. Duran et al. 2004, McMillen-Jackson & Bert 2004, Perrin et al. 2004, Provan et al. 2005).

Nuestros datos sugieren que la explosión demográfica ocurrió hace ~133000 años. Como es habitual en el análisis de la distribución *mismatch*, la estima del tiempo acontecido desde la expansión mostró una variabilidad sustancial. En todo caso, a la luz de los datos obtenidos, parece improbable que ésta tuviera lugar tras el último periodo glacial. Esta afirmación toma mayor fuerza si se tiene en cuenta, además, que la estima proporcionada se basa en una tasa de divergencia calculada por medio de una calibración ístmiana (Hellberg & Vacquier 1999) y que una recalibración más reciente usando el registro fósil sugiere que podría estar sobrestimada en un 40% (Marko 2002). Si dicha sospecha fuese cierta, la época inferida para la ocurrencia de la expansión demográfica podría estar incluso más alejada del último periodo glacial.

Otros estudios recientes también sugieren que muchas especies marinas (al menos en el noroeste europeo), a diferencia de la mayoría de las especies terrestres, podrían haber experimentado expansiones demográficas anteriores al último máximo glacial (Chevolot et al. 2006). Los ejemplos incluyen equinodermos (Duran et al. 2004), poliquetos (Jolly et al. 2006), rodófitas (Provan et al. 2005) y peces (Gysels et al. 2004, Chevolot et al. 2006). En los tres primeros casos se ha estimado que tales expansiones habrían ocurrido tras la penúltima glaciación (Saaliense) cuyo final ha sido datado hace ~140000 años (Svendsen et al. 2004), mientras que en el grupo de los peces las inferencias se remontan incluso más atrás y se sitúan en los anteriores periodos interglaciares (i.e. Holsteiniense: 200000-300/380000 BP y Cromeriense: 400000-750000 BP). Nuestros resultados concuerdan entonces con lo

estimado para otros invertebrados bentónicos y macroalgas marinas, y refuerzan la percepción de que el penúltimo máximo glacial podría haber representado una influencia mayor que la última glaciación en la demografía de estos organismos. Esta mayor influencia se relacionó con diferencias en las condiciones climáticas de ambos periodos (Jolly et al. 2006). De hecho, la glaciación Saaliense parece haber determinado uno de los periodos más severos del Cuaternario (Svendsen et al. 2004).

La relación entre diversidad genética y latitud tampoco parece ajustarse a las predicciones clásicas establecidas para la historia postglacial de los organismos. Los patrones de diversidad genética han servido para inferir rutas de colonización a escala oceánica. Por ejemplo, invasión de la costa este americana desde el Pacífico (Olsen et al. 2004) o invasión de dicha costa desde Europa (Wares & Cunningham 2001). Sin embargo, a escala regional, el supuesto patrón de descenso de la diversidad genética con el incremento de la latitud constituye una excepción, al menos en organismos marinos, y sólo se han encontrado algunos ejemplos para crustáceos (McMillen-Jackson & Bert 2004) y peces (Gysels et al. 2004). Así pues, nuestros resultados también concuerdan con lo ya establecido para otras especies costeras. Entre las causas sugeridas para explicar la ausencia del anterior patrón en la mayoría de los estudios marinos se incluyen: (i) elevados niveles de flujo genético en muchas especies (Gysels et al. 2004) y (ii) gran complejidad de rutas de recolonización desde múltiples refugios glaciales, algunos situados en latitudes "anómalas" (Provan et al. 2005, Jolly et al. 2006).

La relación observada entre diversidad genética y latitud en *Nassarius reticulatus* parece ajustarse a un modelo unimodal. Las mayores estimas de diversidad se midieron en las costas del norte y noroeste de la Península Ibérica mientras que los valores más bajos se situaron en el sur de las Islas Británicas y el sur de Portugal. La posible existencia de poblaciones refugio en las costas del norte y noroeste de la Península Ibérica concordaría con las predicciones hechas para organismos costeros del atlántico europeo (Coyer et al. 2003, Chevolot et al. 2006) pues durante los periodos glaciales las capas de hielo se extendieron aproximadamente hasta el Golfo de Vizcaya (Svendsen et al. 2004). Los datos obtenidos con otras especies del intermareal atlántico sugieren que dichas poblaciones refugio se situaron en latitudes algo más altas, i.e. costas de la Bretaña francesa y del Canal de la Mancha

(Coyer et al. 2003, Olsen et al. 2004, Provan et al. 2005). Sin embargo, tal discrepancia podría estar relacionada con los óptimos térmicos de las especies implicadas, ya que a diferencia de *N. reticulatus*, los tres ejemplos anteriores corresponden a especies típicas de zonas templado-frías. Un resultado más conflictivo es la aparente atenuación de la diversidad genética hacia el sur, si bien esta situación tampoco constituye una excepción en la literatura. Se ha descrito un patrón semejante para algunas especies de algas y fanerógamas marinas, atribuido a la presencia de poblaciones genéticamente empobrecidas en los límites de su rango de distribución (Coyer et al. 2003, Olsen et al. 2004). Tal explicación parece no obstante difícilmente aplicable a nuestro caso ya que el rango actualmente aceptado de la especie incluye las costas de los mares Mediterráneo y Negro. Sin descartar un posible artefacto de los datos, una explicación alternativa para esta atenuación podría ser la postulada por Hewitt (1999), i.e. eventos de cuellos de botella a causa de calentamientos locales súbitos en poblaciones refugio situadas en latitudes meridionales.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avice JC (1992) Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos* 63: 62-76
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48
- Barber PH, Palumbi SR, Erdmann MV, Moosa MK (2002) Sharp genetic breaks among populations of *Haptosquilla pulchella* (Stomatopoda) indicate limits to larval transport: patterns, causes, and consequences. *Mol Ecol* 11: 659-674
- Barreiro R, Couceiro L, Quintela M, Ruiz JM (2006) Population genetic structure of the prosobranch *Nassarius reticulatus* (L.) in a ria seascape (NW Iberian Peninsula) as revealed by RAPD analysis. *Mar Biol* 148: 1051-1060
- Barroso CM, Moreira MH (1998) Reproductive cycle of *Nassarius reticulatus* in the Ria de Aveiro, Portugal: implications for imposex studies. *J Mar Biol Ass UK* 78: 1233-1246
- Bentzen P, Taggart CT, Ruzzante DE, Cook D (1996) Microsatellite polymorphism and the population structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the northwest Atlantic. *Can J Fish Aquat Sci* 53: 2706-2721
- Bernal-Ramírez JH, Adcock GJ, Hauser L, Carvalho GR, Smith PJ (2003) Temporal stability of genetic population structure in the New Zealand snapper, *Pagrus auratus*, and relationship to coastal currents. *Mar Biol* 142: 567-574
- Bernardi G (2000) Barriers to gene flow in *Embiotoca jacksoni*, a marine fish lacking a pelagic larval stage. *Evolution* 54: 226-237
- Bohonak AJ (1999) Dispersal, gene flow, and population structure. *Q Rev Biol* 74: 21-45
- Bohonak AJ (2002) IBD (Isolation by distance): A program for analysis of isolation by distance. *J Hered* 93: 153-154
- Botsford LW, Michell F, Hastings A (2003) Principles for the design of marine reserves. *Ecol Appl* 13: S25-S31
- Caley MJ, Carr MH, Hixon MA, Hughes TP, Jones GP, Menge BA (1996) Recruitment and the local dynamics of open marine populations. *Annu Rev Ecol Syst* 27: 477-500
- Cassens I, Van Waerebeek K, Best PB, Crespo A, Reyes J, Milinkovitch MC (2003) The phylogeography of dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*): a critical examination of network methods and rooting procedures. *Mol Ecol* 12: 1781-1792
- Castillo AGF, Martínez JL, García-Vázquez E (2004) Fine spatial structure of Atlantic hake (*Merluccius merluccius*) stocks revealed by variation at microsatellite loci. *Mar Biotechnol* 6: 299-306

- Collin R (2001) The effects of mode of development on phylogeography and population structure of North Atlantic *Crepidula* (Gastropoda: Calyptraeidae). *Mol Ecol* 10: 2249-2262
- Coyer JA, Peters AF, Stam WT, Olsen JL (2003) Post-ice age recolonization and differentiation of *Fucus serratus* L. (Phaeophyceae; Fucaceae) populations in Northern Europe. *Mol Ecol* 12: 1817-1829
- Chevolot M, Hoarau G, Rijnsdorp AD, Stam WT, Olsen JL (2006) Phylogeography and population structure of thornback rays (*Raja clavata* L., Rajidae). *Mol Ecol* 15: 3693-3705
- Duran S, palacín C, Becerro MA, Turón X, Giribet G (2004) Genetic diversity and population structure of the commercially harvested sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Mol Ecol* 13: 3317-3328
- Eriksson S, Tallmark B (1974) The influence of environmental factors on the diurnal rhythm of the prosobranch gastropod *Nassarius reticulatus* (L.) from a non-tidal area. *Zoon* 2: 135-142
- Estoup A, Largiadier CR, Perrot E, Chourrout D (1996) Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Mol Mar Biol Biotech* 5: 295-298
- Exadactylos A, Geffen AJ, Panagiotaki P, Thorpe JP (2003) Population structure of Dover sole *Solea solea*: RAPD and allozyme data indicate divergence in European stocks. *Mar Ecol Prog Ser* 246: 253-264
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 21: 479-491
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotech* 3: 294-299
- Fretter V, Graham A (1985) The prosobranch molluscs of Britain and Denmark. Part 8. Neogastropoda. *J Molluscan Stud*: 435-556
- Fretter V, Graham A (1994) British prosobranch molluscs: Their Functional Anatomy and Ecology, Ray Society, London
- Grosberg R, Cunningham CW (2001) Genetic structure in the sea: from populations to communities. In: Bertness MD, Gaines S, Hay ME (eds) *Marine Community Ecology*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, p 61-84
- Gysels ES, Helleman B, Pampoulie C, Volckaert FAM (2004) Phylogeography of the common goby, *Pomatoschistus microps*, with particular emphasis on the colonization of the Mediterranean and the North Sea. *Mol Ecol* 13: 403-417
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond* 270: 313-321
- Heipel DA, Bishop JDD, Brand AR, Thorpe JP (1998) Population genetic differentiation of the great scallop *Pecten maximus* in western Britain investigated by randomly amplified polymorphic DNA. *Mar Ecol Prog Ser* 162: 163-171
- Hellberg ME, Vacquier VD (1999) Rapid evolution of fertilization selectivity and lysin cDNA sequences in teguline gastropods. *Mol Biol Evol* 16: 839-848
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-914

- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol J Linn Soc* 68: 87-112
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil Trans R Soc Lond B* 359: 183-195
- Hoskin MG (1997) Effects of contrasting models of larval development on the genetic structures of populations of three species of prosobranch gastropods. *Mar Biol* 127: 647-656
- Janson K (1987) Allozyme and shell variation in two marine snails (*Littorina*: Prosobranchia) with different dispersal abilities. *Biol J Linn Soc* 30: 245-256
- Jiang L, Wu WL, Lin YS (1997) Efficient methods for isolating mitochondrial DNA from fresh or fixed molluscan specimens. *Zool Stud* 36: 74-78
- Jolly MT, Jollivet D, Gentil F, Thiébaud E, Viard F (2005) Sharp genetic break between Atlantic and English Channel populations of the polychaete *Pectinaria koreni*, along the North coast of France. *Heredity* 94: 23-32
- Jolly MT, Viard F, Gentil F, Thiebaut E, Jollivet D (2006) Comparative phylogeography of two coastal polychaete tubeworms in the Northeast Atlantic supports shared history and vicariant events. *Mol Ecol* 15: 1841-1855
- Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In: Munro HN (ed) *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York, p 21-132
- Kim SJ, Rodriguez-Lanetty M, Song JI (2003) Genetic population structure of *Littorina brevicula* around Korean waters. *Hydrobiologia* 505: 41-48
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide-sequences. *J Mol Evol* 16: 111-120
- Kinlan BP, Gaines SD (2003) Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: A community perspective. *Ecology* 84: 2007-2020
- Kristensen TK, Yousif F, Radhaug P (1999) Molecular characterisation of *Biomphalaria* spp in Egypt. *J Molluscan Stud* 65: 133-136
- Kyle CJ, Boulding EG (2000) Comparative population genetic structure of marine gastropods (*Littorina* spp.) with and without pelagic larval dispersal. *Mar Biol* 137: 835-845
- Launey S, Ledu C, Boudry P, Bonhomme F, Naciri-Graven Y (2002) Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism. *J Hered* 93: 331-338
- Lebour MV (1931) The larval stages of *Nassarius reticulatus* and *Nassarius incrassatus*. *J Mar Biol Ass UK* 17: 797-818
- Luttikhuisen PC, Drent J, Baker AJ (2003) Disjunct distribution of highly diverged mitochondrial lineage clade and population subdivision in a marine bivalve with pelagic larval dispersal. *Mol Ecol* 12: 2215-2229
- Mantel N (1967) The detection of disease of clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27: 209-220
- Marko PB (1998) Historical allopatry and the biogeography of speciation in the prosobranch snail genus *Nucella*. *Evolution* 52: 757-774

- Marko PB (2002) Fossil calibration of molecular clocks and the divergence times of geminate species pairs separated by the Isthmus of Panama. *Mol Biol Evol* 19: 2005-2021
- McMillen-Jackson AL, Bert TM (2004) Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the blue crab *Callinectes sapidus* in the eastern United States. *Mar Biol* 145: 769-777
- Moritz C, Dowling TE, Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 18: 269-292
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, New York
- Olsen JL, Stam WT, Coyer JA, Reusch TBH, Billingham M, Bostrom C, Calvert E, Christie H, Granger S, La Lumiere R, Milchakova N, Oudot-Le Secq MP, Procaccini G, Sanjabi B, Serrao E, Veldsink J, Widicombe S, Wyllie-Echeverria S (2004) North Atlantic phylogeography and large-scale population differentiation of the seagrass *Zostera marina* L. *Mol Ecol* 13: 1923-1941
- Palumbi SR (2003) Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecol Appl* 13: S146-S158
- Palumbi SR, Gaines SD, Leslie H, Warner RR (2003) New wave: high-tech tools to help marine reserve research. *Front Ecol Evol* 1: 73-79
- Pannacciulli FG, Bishop JDD, Hawkins SJ (1997) Genetic structure of populations of two species of *Chthamalus* (Crustacea: Cirripedia) in the north-east Atlantic and Mediterranean. *Mar Biol* 128: 73-82
- Perrin C, Wing SR, Roy MS (2004) Effects of hydrographic barriers on population genetic structure of the sea star *Coscinasterias muricata* (Echinodermata, Asteroidea) in the New Zealand fiords. *Mol Ecol* 13: 2183-2195
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818
- Provan J, Wattier RA, Maggs CA (2005) Phylogeographic analysis of the red seaweed *Palmaria palmata* reveals a Pleistocene marine glacial refugium in the English Channel. *Mol Ecol* 14: 793-803
- Riginos C, Nachman MW (2001) Population subdivision in marine environments: the contributions of biogeography, geographical distance and discontinuous habitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*. *Mol Ecol* 10: 1439-1453
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9: 552-569
- Roman J, Palumbi SR (2004) A global invader at home: population structure of the green crab, *Carcinus maenas*, in Europe. *Mol Ecol* 13: 2891-2898
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. In: Krawetz S, MaSA (ed) *Bioinformatics Methods and Protocols*, Vol 132. Humana Press Inc., Totowa, NJ, p 365-386
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- Sanjuán A, Comesaña AS, De Carlos A (1996) Macrogeographic differentiation by mtDNA restriction site analysis in the SW European *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *J Exp Mar Biol Ecol* 198: 89-100

- Schneider S, Excoffier L (1999) Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152: 1079-1089
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland
- Shanks AL, Grantham BA, Carr MH (2003) Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves. *Ecol Appl* 13: S159-S169
- Simon-Bouhet B, Garcia-Meunier P, Viard F (2006) Multiple introductions promote range expansion of the mollusc *Cyclope neritea* (Nassariidae) in France: evidence from mitochondrial sequence data. *Mol Ecol* 15: 1699-1711
- Sköld M, Wing SR, Mladenov PV (2003) Genetic subdivision of a sea star with high dispersal capability in relation to physical barriers in a fjordic seascape. *Mar Ecol Prog Ser* 250: 163-174
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995) *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, W.H. Freeman and Co., New York
- Sotka EE, Wares JP, Barth JA, Grosberg RK, Palumbi SR (2004) Strong genetic clines and geographical variation in gene flow in the rocky intertidal barnacle *Balanus glandula*. *Mol Ecol* 13 :2143-2156
- Stæhr PA, Pedersen MF, Thomsen MS, Wernberg T, Krause-Jensen D (2000) Invasion of *Sargassum muticum* in Limfjorden (Denmark) and its possible impact on the indigenous macroalgal community. *Mar Ecol Prog Ser* 207: 79-88
- Star B, Apte S, Gardner JPA (2003) Genetic structuring among populations of the greenshell mussel *Perna canaliculus* revealed by analysis of randomly amplified polymorphic DNA. *Mar Ecol Prog Ser* 249: 171-182
- Svendsen JI, Alexanderson H, Astakhov VI, Demidov I, Dowdeswell JA, Funder S, Gataullin V, Henriksen M, Hjort C, Houmark-Nielsen M, Hubberten HW, Ingolfsson O, Jakobsson M, Kjaer KH, Larsen E, Lokrantz H, Lunkka JP, Lysa A, Mangerud J, Matlouchkov A, Murray A, Moller P, Niessen F, Nikolskaya O, Polyak L, Saarnisto M, Siegert C, Siegert MJ, Spielhagen RF, Stein R (2004) Late quaternary ice sheet history of northern Eurasia. *Quaternary Science Reviews* 23: 1229-1271
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10: 512-526
- Tavaré L (1986) Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. *Lect Math Life Sci* 17: 57-86
- Templeton AR (1998) Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypothesis about gene flow and population theory. *Mol Ecol* 7: 381-397
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882
- Thorpe JP, Solé-Cava AM, Watts PC (2000) Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *Hydrobiologia* 420: 165-184

- Triantafyllidis A, Apostolidis AP, Katsares V, Kelly E, Mercer J, Hughes M, Jorstad K, Tsolou A, Hynes R, Triantafyllidis C (2005) Mitochondrial DNA variation in the European lobster (*Homarus gammarus*) throughout the range. *Mar Biol* 146: 223-235
- Uthicke S, Benzie JAH (2003) Gene flow and population history in high dispersal marine invertebrates: mitochondrial DNA analysis of *Holothuria nobilis* (Echinodermata: Holothuroidea) populations from the Indo-Pacific. *Mol Ecol* 12: 2635-2648
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506-513
- Waples RS (1998) Separating the wheat from the chaff: Patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *J Hered* 89: 438-450
- Wares JP, Cunningham CW (2001) Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution* 55: 2455-2469
- Wares JP, Gaines SD, Cunningham CW (2001) A comparative study of asymmetric migration events across a marine biogeographic boundary. *Evolution* 55: 295-306
- Waters JM, King TM, O'Loughlin PM, Spencer HG (2005) Phylogeographical disjunction in abundant high-dispersal littoral gastropods. *Mol Ecol* 14: 2789-2802
- Waters JM, Roy MS (2004) Phylogeography of a high-dispersal New Zealand sea-star: does upwelling block gene-flow? *Mol Ecol* 13: 2797-2806
- Weetman D, Hauser L, Bayes MK, Ellis JR, Shaw PW (2006) Genetic population structure across a range of geographic scales in the commercially exploited marine gastropod *Buccinum undatum*. *Mar Ecol Prog Ser* 317: 157-169
- Wilke T, Davis GM (2000) Intraspecific mitochondrial sequence diversity in *Hydrobia ulvae* and *Hydrobia ventosa* (Hydrobiidae: Rissooidea: Gastropoda): Do their different life histories affect biogeographic patterns and gene flow? *Biol J Linn Soc* 79: 89-105

C 4

A

P

I

T

U

L

O



CAPÍTULO 4: PRESENCIA DE *CYCLOPE NERITEA* (L.) (GASTROPODA, PROSOBRANCHIA) EN EL NO DE LA PENÍNSULA IBÉRICA: ORIGEN Y GRADO DE IMPOSEX DE LAS POBLACIONES¹

1. INTRODUCCIÓN

2. OBJETIVOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- 3.1. ESCALA GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO Y RECOGIDA DE LAS MUESTRAS
- 3.2. CONTAMINACIÓN POR TRIBUTO DE ESTAÑO (TBT) E IMPOSEX EN *CYCLOPE NERITEA*
- 3.3. ADN MITOCONDRIAL Y ORIGEN DE LAS POBLACIONES GALLEGAS DE *CYCLOPE NERITEA*

4. RESULTADOS

- 4.1. CARACTERÍSTICAS DEL IMPOSEX
- 4.2. INCIDENCIA DEL IMPOSEX
- 4.3. DIVERSIDAD GENÉTICA
- 4.4. COMPOSICIÓN HAPLOTÍPICA Y ESTRUCTURA GENÉTICA

5. DISCUSIÓN

- 5.1. CONTAMINACIÓN POR TRIBUTO DE ESTAÑO (TBT) E IMPOSEX EN *CYCLOPE NERITEA*
- 5.2. ADN MITOCONDRIAL Y ORIGEN DE LAS POBLACIONES GALLEGAS DE *CYCLOPE NERITEA*

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ Una versión de este capítulo ha sido publicada como: Couceiro L, Míguez A, Ruiz JM, Barreiro R (2008) Introduced status of *Cyclope neritea* (Gastropoda, Nassariidae) in the NW Iberian Peninsula confirmed by mitochondrial sequence data. *Mar Ecol Prog Ser* 354:141-146; Quintela M, Couceiro L, Ruiz JM, Barreiro R (2006) Discovery of imposex in the gastropod *Cyclope neritea* now invading Galicia (north-west Spain). *J Mar Biol Ass UK* 86:1171-1173



1. INTRODUCCIÓN

El interés científico acerca de las invasiones biológicas se ha incrementado notablemente en los últimos años, y hoy en día dichas invasiones representan una de las principales preocupaciones en el ámbito de la conservación. El término invasión biológica puede referirse a fenómenos naturales de expansión del rango geográfico de una especie. Esto ocurre por ejemplo mediante sucesos puntuales de dispersión a larga distancia (e.g. Censky et al. 1998) o, a escala de tiempo geológica, como consecuencia de la desaparición de barreras biogeográficas (e.g. Istmo de Panamá). Sin embargo, las invasiones biológicas que actualmente preocupan a la comunidad científica son las provocadas por la actividad humana, tanto de manera intencionada (e.g. especies de cultivo) como accidental (e.g. transporte de organismos marinos en el agua de lastre de los barcos o los cascos de las embarcaciones, liberaciones accidentales de mascotas o evasiones de acuarios, zoológicos y jardines botánicos) (Carlton & Geller 1993, Lewis et al. 2003, Clergeau & Yésou 2006, Román-Muñoz & Real 2006).

Las introducciones biológicas pueden provocar impactos de muy diversa índole en su nueva área de distribución (Van der Velde et al. 2006):

- Impacto ecológico. Los efectos perjudiciales de muchas invasiones biológicas resultan del comportamiento de la especie introducida como “enemigo” de las especies nativas (depredador, herbívoro o patógeno). De igual modo, la especie introducida puede mostrar más eficacia en la adquisición de recursos desplazando a las especies nativas (competencia). En algunos casos el efecto de las especies invasoras supera el estrictamente poblacional al alterar procesos a escala de todo el ecosistema (e.g. ciclo del nitrógeno, ciclo hídrico o régimen de incendios; revisado en Mack & D'Antonio 1998).

- Impacto evolutivo. La hibridación de especies invasoras y nativas íntimamente relacionadas impide la especiación alopátrica restringiendo así la futura biodiversidad de la región. Dicho proceso altera también la diversidad genética de las poblaciones y puede reducir su resistencia frente a infecciones y parásitos (depresión exogámica). Un ejemplo clásico de dicho impacto puede encontrarse en las marismas de la Bahía de San Francisco donde la nativa *Spartina foliosa* se ha visto muy desplazada por el híbrido surgido entre dicha especie y su congénere *Spartina alterniflora*, introducida allí a mediados de la década de 1970 (Daehler & Strong 1997).
- Impacto económico. Los beneficios de la agricultura, acuicultura y ganadería pueden verse severamente reducidos como consecuencia de la introducción de especies exóticas. Además, dichas especies también pueden ocasionar importantes daños en diversas infraestructuras (e.g. la obstrucción de tuberías de plantas energéticas por el mejillón cebra –*Dreissena polymorpha*– cuesta al gobierno canadiense unos 8 millones de dólares al año, Colautti et al. 2006).
- Impacto sobre la salud humana. Algunas especies exóticas no sólo representan una “molestia” para el hombre, si no que también pueden actuar como vectores de infecciones (e.g. ciertas especies de mosquitos).

La introducción de especies exóticas ha tenido consecuencias particularmente dramáticas en ecosistemas insulares donde la flora y fauna endémicas pueden verse severamente amenazadas. No obstante, las áreas costeras del planeta ocupan los primeros puestos en la lista de los sistemas más afectados (Grosholz 2002). Además, se sospecha que la gravedad del problema en esos ecosistemas podría estar incluso subestimada a causa de las incertidumbres sobre la taxonomía y biogeografía histórica de muchos de sus organismos (Geller et al. 1997). Un ejemplo de esas limitaciones son las denominadas especies criptogénicas, *i.e.* especies en las que no se puede demostrar con certeza su estatus nativo o introducido. Al menos en estuarios y áreas costeras, las especies criptogénicas son tan frecuentes como las especies reconocidamente exóticas (Carlton 1996). El término especie criptogénica ha sido utilizado de manera amplia en la literatura, aplicándose a : (i) organismos de distribu-

ción cosmopolita para los cuáles no se puede determinar si ésta es resultado de procesos naturales o ha sido mediada por el hombre (e.g. *Teredo navalis*, Carlton 1992); (ii) complejos de especies crípticas consideradas erróneamente como un único taxón (e.g. *Carcinus* spp., Geller et al. 1997); y (iii) especies con una supuesta área de introducción próxima a su rango nativo donde es complicado determinar si la expansión es resultado de procesos naturales o actividades humanas, sobre todo en un momento en que se sospecha que el calentamiento global está alterando la distribución de muchos organismos (e.g. *Cyclope neritea*, Simon-Bouhet et al. 2006).

El gasterópodo marino *Cyclope neritea* (Nassariidae) es un buen ejemplo de esta última situación. Esta especie es nativa del Mar Mediterráneo y de las costas atlánticas de Marruecos y sur de la Península Ibérica pero, al igual que otros organismos con similar distribución, exhibe un rango geográfico disjunto apareciendo también de modo natural en las costas del sur del Golfo de Vizcaya (Hidalgo 1917, para un resumen detallado de los registros publicados de esta especie a lo largo de las costas atlánticas ver Sauriau 1991). Desde finales de la década de 1970 se han registrado nuevas poblaciones de esta especie a lo largo de las costas atlánticas francesas, más allá de su límite norte de distribución: Bahía de Arcachon (1976); Bahía de Marennes-Oléron, Isla de Ré y Golfo de Morbihan (1983-1984); y más recientemente (desde el año 2000) a lo largo de las costas del Canal de la Mancha (revisado en Bachelet et al. 2004). Inicialmente, el transporte de bivalvos (principalmente ostras) para cultivo y engorde en dicha área fue identificado como el mecanismo más probable de expansión de la especie en la región, quizás favorecido por el suave incremento de las temperaturas registrado a lo largo de dichas costas durante el periodo 1970-1990 (Sauriau 1991, Bachelet et al. 2004). Sin embargo, algunos detalles de la estructura genética de estas nuevas poblaciones revelados recientemente han reabierto la posibilidad de que este gasterópodo estuviese presente en el área antes de la década de 1970, mostrando así características de una especie criptogénica (Simon-Bouhet et al. 2006).

A principios de la década de 1990 también se detectó por primera vez una población permanente y moderadamente abundante de *Cyclope neritea* en otra región fuera de su rango nativo reconocido: la costa atlántica de Galicia (Rolán 1992). Este gasterópodo permaneció confinado en ese

enclave (A Toxa, en la orilla sur de la Ría de Arousa) durante una década pero, a partir del año 2000, comenzó a incrementar su presencia en la región. Hoy día se pueden encontrar poblaciones muy densas a lo largo de la orilla sur de la Ría de Arousa; e incluso se ha registrado una población aislada en la adyacente ría de Pontevedra (Quintela et al. 2006). Las cuatro grandes rías gallegas (Muros, Arousa, Pontevedra y Vigo) sostienen una importante industria acuícola (principalmente mejillón y varias especies de almeja). El transporte de bivalvos, muchas veces de fuentes lejanas, para cultivo y engorde es una práctica habitual en la región. Parece entonces que la hipótesis más plausible para explicar la introducción de este gasterópodo en aguas gallegas podría ser el transporte accidental junto con algunos de esos bivalvos comerciales. No obstante, como Galicia está a medio camino entre el límite norte del rango de distribución continuo de esta especie (Setúbal, Portugal) y los enclaves aislados del sur del Golfo de Vizcaya históricamente reconocidos como poblaciones naturales, no se puede descartar sin más la hipótesis de que su actual expansión sea resultado de un proceso natural, tal vez favorecida por un supuesto incremento de la temperatura en el área. Por otra parte, tampoco se puede descartar la influencia de otros factores en esta expansión. Así, la contaminación por tributilo de estaño (TBT) ha llevado a la desaparición a poblaciones de gasterópodos en las pasadas décadas, particularmente en especies sin fase dispersiva clara como *Cyclope neritea* (e.g. *Nucella lapillus*, Gibbs & Bryan 1986). Caso de que la contaminación con TBT afectase a esta especie al igual que a otros miembros de su familia, cabe la posibilidad de que el descenso registrado para los niveles del contaminante en el área a lo largo de los últimos años (ver Capítulo 1 de la presente memoria) haya favorecido también el asentamiento y expansión de este gasterópodo en la región.

2. OBJETIVOS

En relación con las dos líneas fundamentales de investigación expuestas en la presente memoria (contaminación por tributilo de estaño –TBT– y aplicación de técnicas moleculares en el estudio de la dispersión), este trabajo pretende:

1. Investigar si, al igual que ocurre con otros gasterópodos prosobranquios, las hembras de esta especie desarrollan órganos sexuales masculinos ante la contaminación por TBT (*i.e.* imposex). Caso de registrarse dicha anomalía, se proporcionará por primera vez una descripción detallada de sus características y modo de evolución y se cuantificará el grado de afectación que sufren las poblaciones gallegas de la especie.
2. Emplear secuencias del gen mitocondrial Citocromo c Oxidasa Subunidad I (COI) para: (i) determinar si las poblaciones gallegas tienen su origen en una introducción accidental mediada por el hombre (transporte de bivalvos comerciales) o, por el contrario, son resultado de una expansión natural de su rango geográfico desde enclaves naturales próximos (*i.e.* Golfo de Vizcaya, sur de la Península Ibérica) y (ii) caso de confirmarse la hipótesis de una introducción accidental, determinar si la actual proliferación de *C. neritea* en la región debe ser interpretada como una expansión a partir de la población detectada a principios de la década de 1990 o, por el contrario, es consecuencia de introducciones múltiples e independientes.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ESCALA GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO Y RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

Se recogieron ejemplares adultos de *Cyclope neritea* durante los meses de Febrero–Marzo de 2005 (estudio de imposex) y Enero de 2006 (estudio de ADN mitocondrial) en 3 localidades (Fig. 1) que abarcan el rango actualmente conocido de la especie en el noroeste de la Península Ibérica: orilla sur de la Ría de Arousa (localidades: A Toxa y Vilagarcía) y un enclave aislado en la ría adyacente de Pontevedra (Poio). En ambas ocasiones un número elevado de individuos pudo capturarse fácilmente en las tres poblaciones durante la marea baja, a mano y con la ayuda de un cebo.

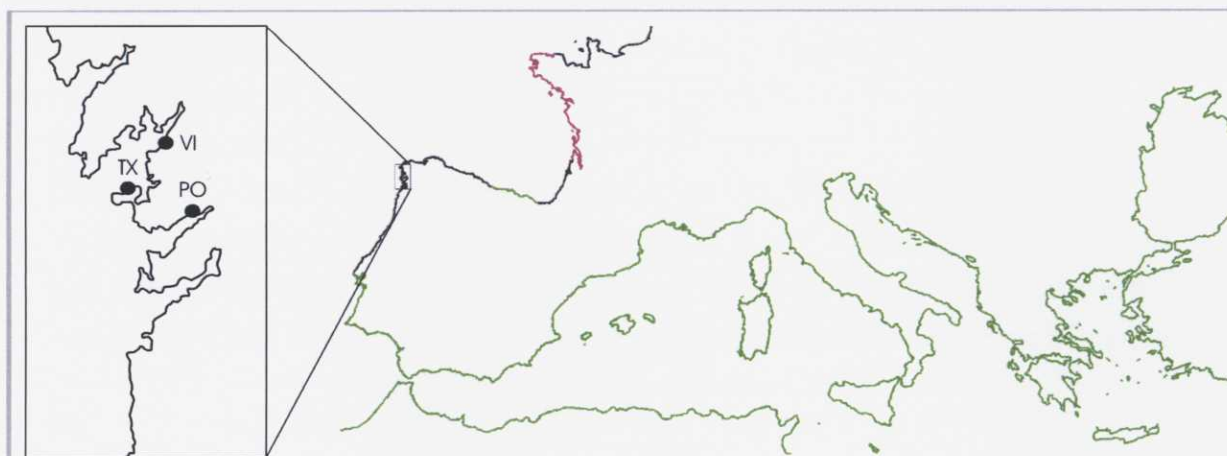
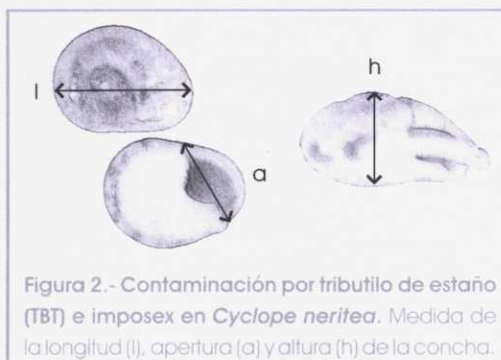


Figura 1.- Escala geográfica del estudio y recogida de las muestras. Situación de las localidades estudiadas en la costa atlántica gallega: VI: Vilagarcía y TX: A Toxa (Ría de Arousa), PO: Poio (Ría de Pontevedra). El rango nativo de la especie es indicado con color verde; el color púrpura denota la región del atlántico francés donde se han detectado poblaciones de la especie desde la década 1970.

3.2. CONTAMINACIÓN POR TRIBUTILO DE ESTAÑO (TBT) E IMPOSEX EN *CYCLOPE NERITEA*

Anticipando que la expresión del imposex en *Cyclope neritea* podría ser similar a la de otros Nassariidae, los individuos de esta especie se examinaron utilizando los protocolos establecidos para *Nassarius reticulatus* (Capítulo 1 de la presente memoria). Brevemente, tras narcotizar los individuos:

1. Se midió la longitud, altura y apertura de la concha con un calibre digital aproximando hasta centésimas de milímetro (Fig. 2).



2. Se rompió la concha con un torno, se extrajo el animal cuidadosamente y se determinó su sexo.
3. Se midió la longitud del pene en los ejemplares de ambos sexos (bajo el estereomicroscopio, con calibre digital y aproximando hasta centésimas de milímetro).
4. Se estudió el aparato genital de las hembras cuidadosamente tras rasgar longitudinalmente el techo de la cavidad del manto con el objetivo de determinar la extensión del vaso deferente y observar cualquier anomalía en la formación de las cápsulas de huevos.
5. También se examinó la porción gonadal del oviducto para determinar su posible masculinización (i.e. convolución simulando la vesícula seminal masculina) y, caso de registrarse ésta, establecer su intensidad.

3.3. ADN MITOCONDRIAL Y ORIGEN DE LAS POBLACIONES GALLEGAS DE *CYCLOPE NERITEA*

El procesamiento de las muestras destinadas al estudio de ADN mitocondrial también fue muy similar al detallado para *Nassarius reticulatus* (Capítulo 3 de la presente memoria):

1. Tras romper la concha, se escindió el pie de los individuos para luego lavarlo con agua destilada y conservarlo en etanol 96%.
2. Se extrajo el ADN del anterior tejido con una disolución de Chelex-100 (*Bio-Rad Laboratorios*; Hercules, CA, EE.UU.) (Walsh et al. 1991, Estoup et al. 1996).
3. Se amplificó un fragmento de 533 bp del gen mitocondrial Citocromo c Oxidasa Subunidad I (COI) utilizando los cebadores diseñados por Bachelet et al. (2004): Cy2 5'-GTAAATTCGATCTGTA-3' y CyR 5'-GGATTAGTTGGTACAGC-3'. La reacción de PCR se llevó a cabo en 25 µl con 0.5 µM de cada cebador, 0.2 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0.4 U de ADN Taq polimerasa (*BIOTAQ™ DNA Polymerase*; *Bioline Laboratories*, Londres, UK), tampón de PCR 1x (10x *Bioline NH₄ PCR Buffer*), 1 µl del extracto de ADN y agua desionizada (Milli-Q) estéril. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador *PxE Hybaid* (*Mandel Scientific Company Inc.*, Ontario, Canadá) con el perfil: 3 min a 93 °C; 40 ciclos de 30 s a 93 °C, 30 s a 53 °C y 1 min a 72 °C; 10 min a 72 °C.
4. Las reacciones se comprobaron por electroforesis en gel de agarosa 1.5% en tampón TBE 1x. Los productos de PCR se purificaron con las enzimas *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) y *Exonuclease I* (Exo) (*Amersham Pharmacia Biotech Inc.*, Piscataway, NJ, EE.UU.).
5. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con el preparado comercial *CEQ™ DTCS Quick Start kit* (*Beckman Coulter*, Fullerton, CA, EE.UU.), las muestras se precipitaron en etanol y se procedió a su lectura en un secuenciador automático *Beckman Coulter CEQ 8000 Genetic Analysis System* (*Beckman Coulter*).
6. Finalmente, las secuencias se alinearon con el software *ClustalX* (Thompson et al. 1997) y se compararon con las publicadas en *GenBank* utilizando el programa *BLAST* (Altschul et al. 1990). Siempre que fue posible, los haplotipos se codificaron de acuerdo con Simon-Bouhet et al.

(2006). El análisis estadístico de los datos incluyó aquellos procedimientos descritos en el Capítulo 3: estimas de diversidad genética, análisis de la varianza molecular o AMOVA, estadísticos *pairwise* Φ_{ST} y red haplotípica.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DEL IMPOSEX

El desarrollo del imposex en *Cyclope neritea* y *Nassarius reticulatus* parece ocurrir de un modo muy similar: (i) los estadios iniciales se caracterizan por la presencia de un pequeño pene y/o conducto deferente; (ii) esas estructuras crecen progresivamente; (iii) en estadios avanzados es posible observar un pene de longitud considerable y un vaso deferente completo –que se extiende desde la base de dicho órgano hasta la altura de la papila genital femenina–; (iv) finalmente, el conducto deferente continúa su crecimiento más allá de la apertura del oviducto de manera que el desarrollo de órganos sexuales masculinos no parece perturbar la organización normal del tracto genital femenino. Pese a esto, en Poio hallamos una hembra con una masa de cápsulas abortadas dentro de la glándula de la cápsula (Fig. 3). Este ejemplar también presentó un aspecto muy similar al de las hembras estériles de *N. reticulatus* registradas en enclaves muy contaminados de las costas gallegas (Barreiro et al. 2001, Capítulo 1 de la presente memoria): (i) el individuo exhibía un vaso deferente completo que se prolongaba más allá de la papila genital hacia el interior del canal ventral de la glándula de la cápsula; (ii) la papila genital femenina no parecía estar ocluida por dicho vaso deferente (a diferencia de lo que ocurre en *Nucella lapillus*, Gibbs & Bryan 1986); y (iii) ningún rasgo externo obvio permitió diferenciar esta hembra de otras con un imposex de igual intensidad pero sin material abortado en su interior.

La homología en la evolución del imposex en ambas especies permitió aplicar idénticos criterios para definir los distintos estadios de desarrollo y calcular el índice VDSI (Barreiro et al. 2001): (i) estadio 0, hembra normal no afectada; (ii) estadio 1, individuos con un pene rudimentario o una pequeña sección del vaso deferente distal; (iii) estadio 2, individuos con pene y vaso deferente de longitud no

mayor que la mitad de la distancia entre la base del pene y la vulva; (iv) estadio 3, individuos con pene y vaso deferente cuya longitud sobrepasa la mitad de la distancia entre la base del pene y la vulva; (v) estadio 4, individuos con pene y vaso deferente desde la base del pene hasta la vulva; y (vi) estadios 4⁺ y 4p –estos dos estadios reciben el valor numérico de 4.5 a fin de calcular el VDSI–, individuos con pene y vaso deferente que sobrepasa la vulva hacia el canal ventral de la glándula de la cápsula (4⁺) o sigue paralelo al oviducto hasta alcanzar la zona posterior de la cavidad paleal (4p).

Por otra parte, el pene de *Cyclope neritea* también exhibe una morfología similar al de *Nassarius reticulatus* (crecimiento principalmente longitudinal). En consecuencia, para medir su grado de desarrollo en hembras se utilizó su longitud, y la intensidad de la respuesta en las poblaciones se cuantificó con el Índice de la Longitud Relativa del Pene ($RPLI = [\text{longitud media del pene de las hembras} / \text{longitud media del pene de los machos}] \times 100$).

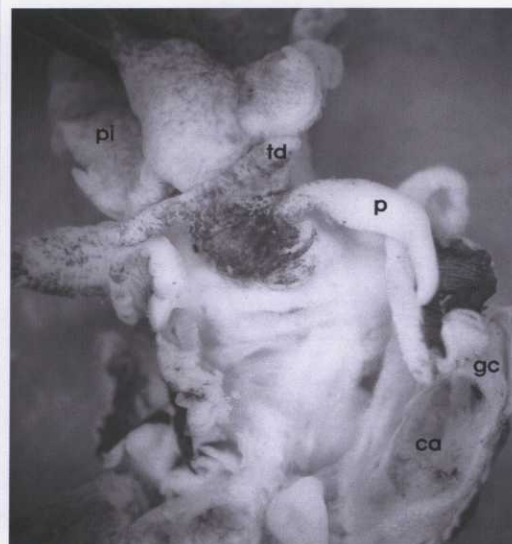


Figura 3.- Características del imposex. Vista dorsal de la cavidad del manto de una hembra estéril encontrada en la localidad de Poio. Abreviaturas: ca (cápsulas abortadas), gc (glándula de la cápsula), p (pene), pi (pie) y td (tentáculo derecho).

Finalmente, al igual que ocurre en otros nasáridos (e.g. *Ilyanassa obsoleta*: Smith 1980, *Nassarius reticulatus*: Barreiro et al. 2001), la masculinización sufrida por las hembras de *Cyclope neritea* no implicó sólo el desarrollo de pene y conducto deferente. En las hembras más afectadas se observó también un oviducto distal convolucionado. El grado de convolución del oviducto se determinó de acuerdo con la escala cualitativa propuesta para *Nassarius reticulatus*: oviductos rectos, suavemente convolucionados y fuertemente convolucionados se puntuaron como 0, 1 y 2 respectivamente (Barreiro et al. 2001). Su valor medio en las poblaciones se utilizó como un tercer índice de imposex (Índice del Grado de Convolución del Oviducto, AOS).

4.2. INCIDENCIA DEL IMPOSEX

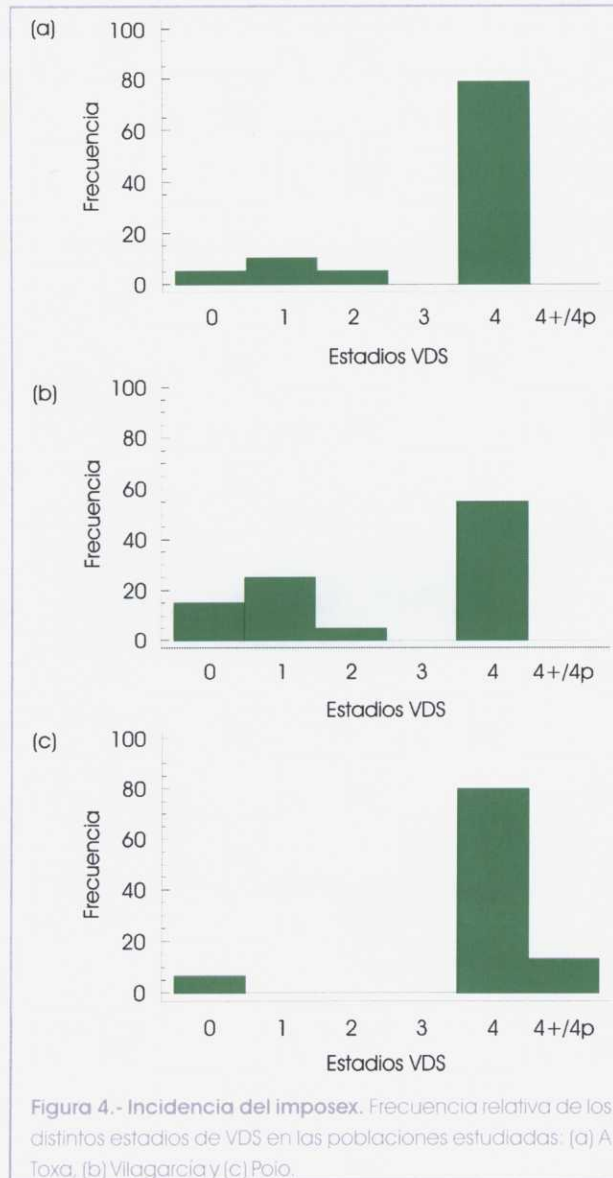
Se examinaron un total de 90 individuos (30 ejemplares por localidad). En A Toxa y Vilagarcía, el número de hembras duplicó el de machos (19 y 20 hembras respectivamente) mientras que en Poio la proporción de sexos fue 1 (Tabla 1). Pese a que se estudió un número relativamente alto de hembras (54), sólo se hallaron 5 individuos sin rasgos masculinos y el porcentaje de hembras afectadas superó en las 3 localidades el 80% (Tabla 1).

Localidad	Latitud	Longitud	M : F	%I	RPLI	VDSI	AOS	%EST
RÍA DE AROUSA								
A Toxa	42°28'57"	08°51'01"	11 : 19	95	15.1	3.37	0.42	-
Vilagarcía	42°36'30"	08°46'12"	10 : 20	85	20.3	2.55	0.05	-
RÍA DE PONTEVEDRA								
Poio	42°25'20"	40°58'01"	15 : 15	93	37.2	3.80	0.50	6.7

Tabla 1.- Incidencia del imposex. Valores registrados en las localidades estudiadas para: la proporción de sexos (M : F), el porcentaje de hembras afectadas (%I), el índice de la Longitud Relativa del Pene (RPLI), el índice de la Secuencia del Vaso Deferente (VDSI), el índice del Grado de convolución del Oviducto (AOS) y el porcentaje de hembras estériles (%EST).

Vilagarcía exhibió el valor más bajo de VDSI, en las otras dos localidades este índice tomó valores similares (Tabla 1). No obstante, la distribución de frecuencias de los estadios de VDS reveló una mayor coherencia geográfica (Fig.4). Los individuos con VDS 4 predominaron en la Ría de Arousa (80% de hembras en A Toxa y 60% en Vilagarcía), mostrando el resto de ejemplares un imposex bajo o moderado (estadios 0-2). En Poio, la mayoría de las hembras también exhibieron VDS 4 (80%); sin embar-

go, a diferencia de en Arousa, los restantes individuos tomaron valores extremos de imposex (estadios 0 y 4+/4p).



Los valores de RPLI también indicaron más masculinización en Poio (Tabla 1). En las 3 localidades, la mayoría de machos tenía penes de 9–11 mm. Los penes en las hembras de la Ría de Arousa raramente superaron los 4 mm; en Poio, una fracción relativamente importante tenía penes de 3–5 mm pero algunos individuos superaron incluso los 8 mm (Fig. 5).

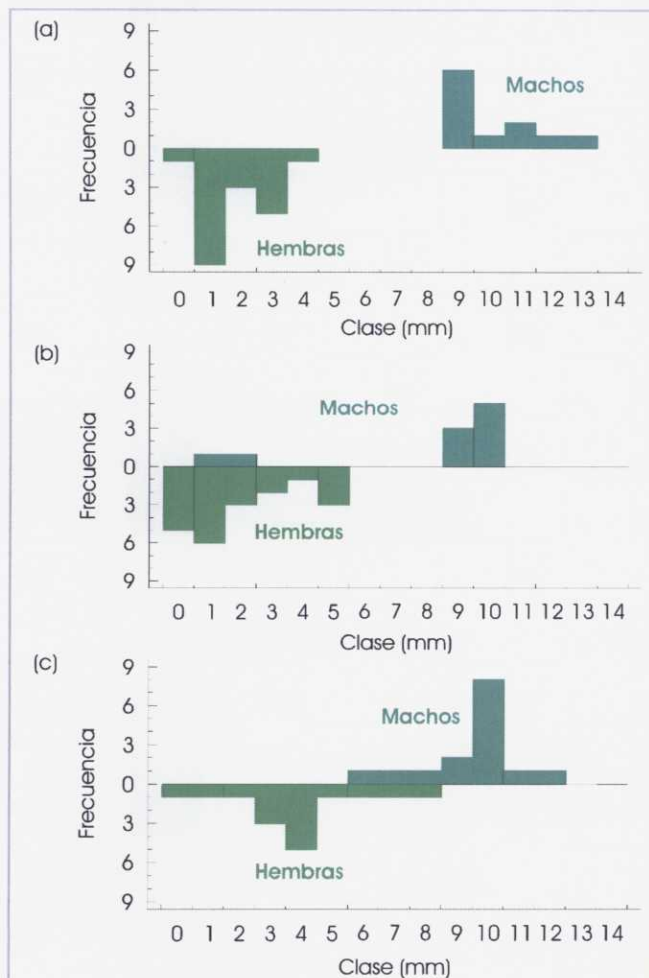
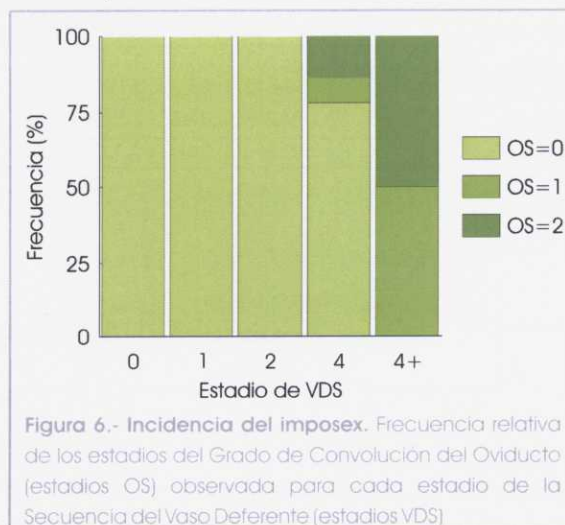


Figura 5.- Incidencia del imposex. Distribución de frecuencias de la longitud del pene de machos y hembras en las poblaciones estudiadas: (a) A Toxa, (b) Vilagarcía y (c) Poio.

En la Fig. 5 también se observa la presencia de 2 machos atípicos en la localidad de Vilagarcía (con penes <3 mm); eliminando estos ejemplares del conjunto de datos se reduce considerablemente el RPLI obteniéndose un valor de 16.7 más coherente con el VDSI de la localidad.

Los valores de AOS fueron coherentes con los otros índices de imposex: 0.50 en Poio frente a 0.42 en A Toxa y 0.05 en Vilagarcía. Al igual que en *Nassarius reticulatus* (Barreiro et al. 2001, Capítulo 1), sólo se detectaron oviductos deformados en hembras con VDS avanzado; ninguna hembra con VDS 0–2 mostró esa deformación mientras que la convolución del oviducto distal se detectó en cerca del 25% de las hembras con VDS 4 y en todas las hembras con VDS 4+ o 4p (Fig. 6).



Finalmente, en Poio se halló una hembra con material abortado en el interior de la glándula de la cápsula. El aspecto de este material (una masa deforme, dura y de coloración oscura) fue muy similar al registrado para hembras de otros gasterópodos prosobranquios procedentes de localidades altamente contaminadas (*Nucella lapillus*, Ruiz et al. 1998; *Nassarius reticulatus*, Barreiro et al. 2001, Capítulo 1). Al igual que en las anteriores especies, este ejemplar de *Cyclope neritea* se caracterizó también por un imposex severo: pene de 5.85 mm, VDS 4p y OS 2.

4.3. DIVERSIDAD GENÉTICA

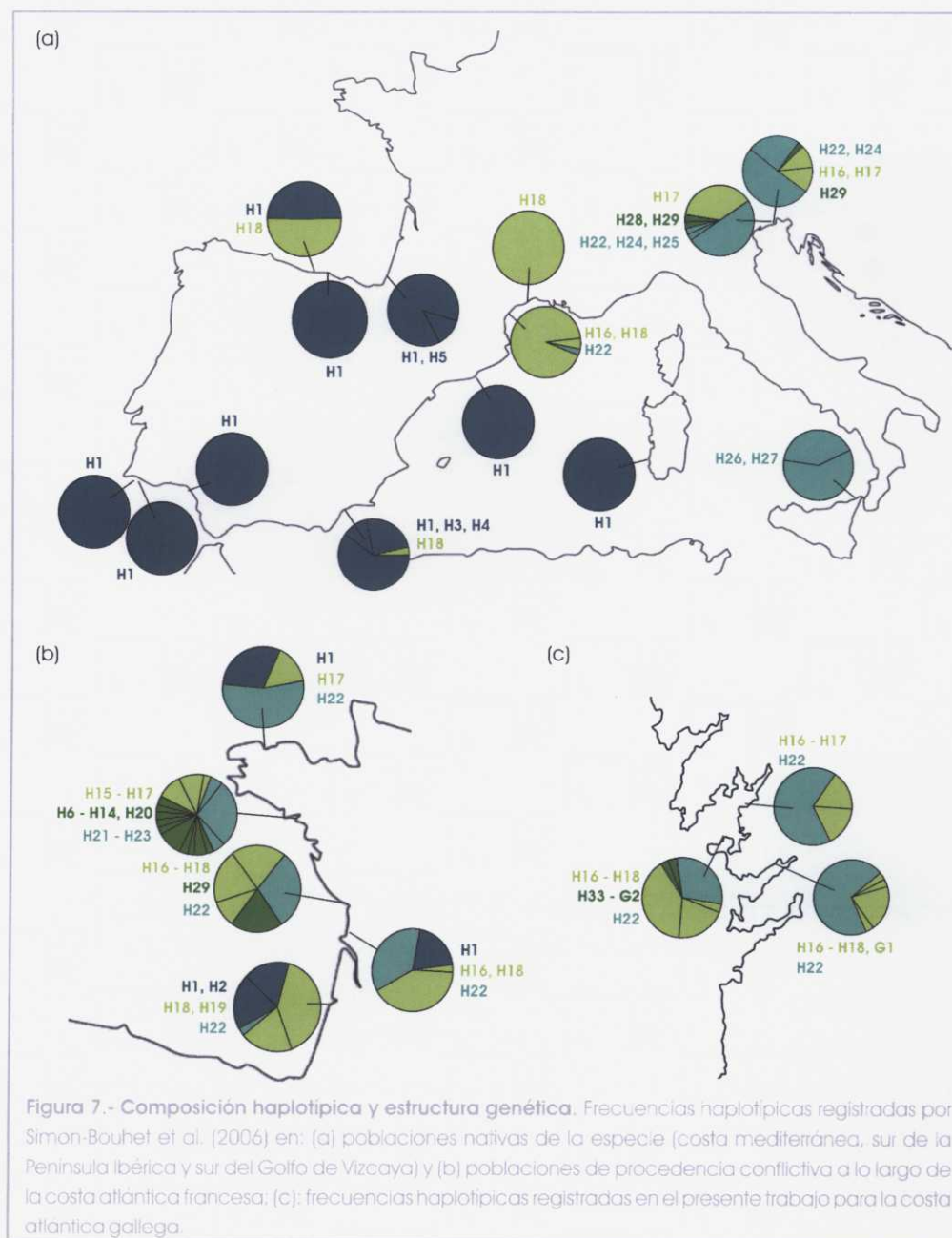
Las tres poblaciones mostraron alta diversidad genética (Tabla 2). El número de posiciones polimórficas osciló entre 12 (Vilagarcía) y 18 (A Toxa), el número de haplotipos varió entre 3 (Vilagarcía) y 6 (A Toxa), la diversidad haplotípica mostró desde 0.483 (± 0.096) (Poio) hasta 0.731 (± 0.046) (A Toxa), y la diversidad nucleotídica fue de 0.00947 (Poio) a 0.01102 (A Toxa). Pese a que los niveles totales de diversidad molecular fueron elevados en las tres localidades, se detectaron diferencias estadísticamente significativas de diversidad nucleotídica y haplotípica entre la población más antigua de la región (A Toxa) y las más recientes (Vilagarcía y Poio) (método GT2, Hochberg 1974).

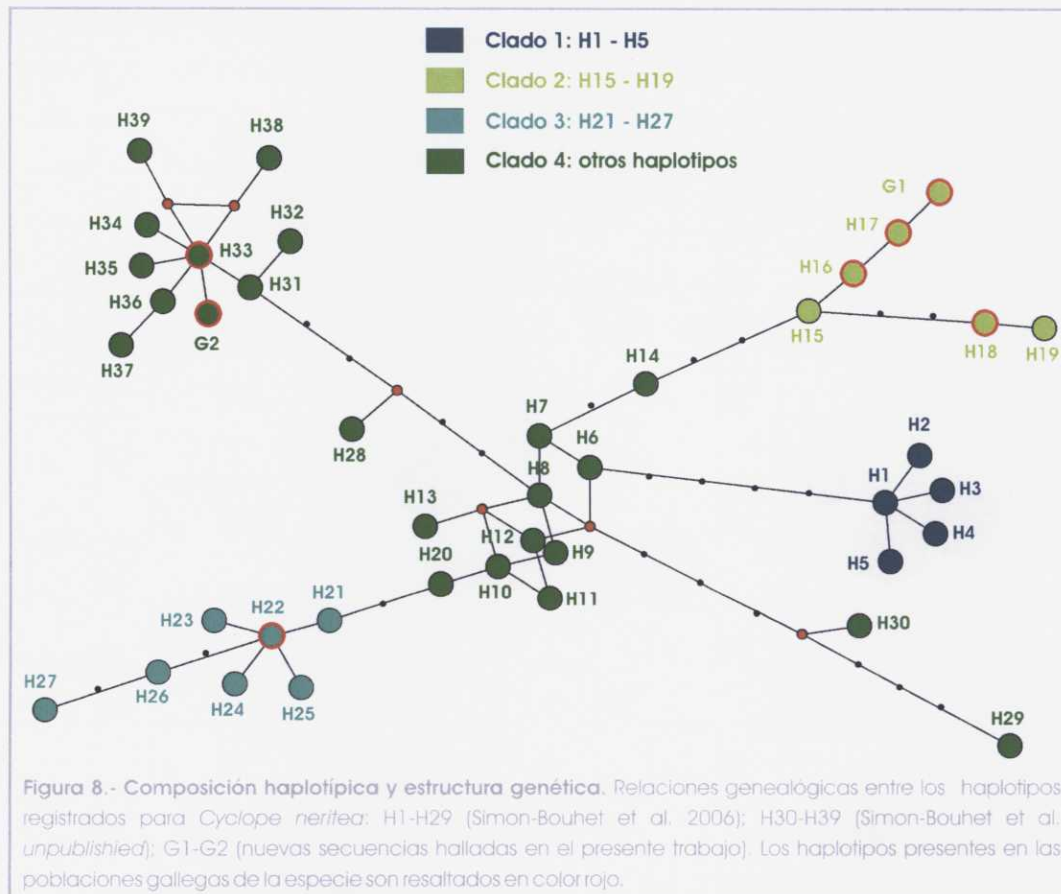
Localidad	n	S	H	Hd (SD)	$\pi \times 10^2$ (SD)
A Toxa	30	18	6	0.731 (0.046)	1.102 (0.128)
Vilagarcía	30	12	3	0.517 (0.088)	1.003 (0.137)
Poio	30	15	5	0.483 (0.096)	0.947 (0.162)
Total	90	19	7	0.614 (0.041)	1.121 (0.045)

Tabla 2.- Diversidad genética. n: tamaño muestral; S: número de posiciones polimórficas; H: número de haplotipos; Hd (SD): diversidad haplotípica (desviación típica); π (SD): diversidad nucleotídica (desviación típica).

4.4. COMPOSICIÓN HAPLOTÍPICA Y ESTRUCTURA GENÉTICA

Se encontró un total de 7 haplotipos distintos; 3 aparecieron en más del 94% de los individuos (H22: 55.6%, H17: 25.6% y H16: 13.3%) y habían sido descritos con anterioridad en un estudio más amplio que cubría una fracción importante del rango de distribución nativo de la especie (Simon-Bouhet et al. 2006) (Fig. 7). Los haplotipos restantes aparecieron en frecuencias muy bajas e incluyeron 2 secuencias nuevas codificadas como G1 y G2 (H18: 2.2%, H33: 1.1%, HG1: 1.1% y HG2: 1.1%) (Fig. 7). G1 (número de acceso en la base de datos *GenBank*: EF534201) mostró una gran proximidad genealógica (1 paso mutacional) con el haplotipo H17; HG2 (*GenBank*: EF534202) también mostró una gran proximidad con otro haplotipo infrecuente (H33, publicado por Simon-Bouhet et al. en *GenBank* con número de acceso DQ985612 (Fig. 8).





Las frecuencias de haplotipos revelaron ciertas diferencias entre las 3 poblaciones (Fig. 7). H22 dominó en las 2 localidades más recientes (Vilagarcía y Poio) mientras que H22, H16 y H17 mostraron frecuencias muy similares en la localidad más antigua (A Toxa). En A Toxa también se encontraron los 2 haplotipos genealógicamente distantes (G2 y H33). De acuerdo con lo anterior, el análisis AMOVA mostró diferencias significativas entre las 3 poblaciones ($\Phi_{ST} = 0.131$, $P < 0.01$). Los estadísticos *pairwise* Φ_{ST} revelaron que la diferenciación genética se debía a que A Toxa poseía una composición haplotípica diferente: las 2 poblaciones más recientes, a pesar de estar en rías distintas, fueron indistinguibles genéticamente (Tabla 3).

	Vilagarcía	Poio	A Toxa
Vilagarcía	-		
Poio	-0.030 ^{NS}	-	
A Toxa	0.168*	0.212***	-

Tabla 3.- Composición haplotípica y estructura genética. Diferenciación genética en términos de los estadísticos *pairwise* Φ_{st} , los valores de significación están basados en 10000 permutaciones: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

5. DISCUSIÓN

5.1. CONTAMINACIÓN POR TRIBUTO DE ESTAÑO (TBT) E IMPOSEX EN *CYCLOPE NERITEA*

Este trabajo proporciona la primera descripción detallada de las características y modo de desarrollo del imposex en el nasárido *Cyclope neritea*. Al igual que en otros gasterópodos, el desarrollo de órganos sexuales masculinos en las hembras constituye un fiel reflejo del tracto genital de los machos en lo relativo a morfología del pene y trayectoria del conducto deferente. Además, al igual que otros Nassariidae, la porción distal del oviducto de los individuos más afectados también muestra modificaciones interpretables como un tercer rasgo masculino (*i.e.* convolución simulando la vesícula seminal, Barreiro et al. 2001). Algunos autores han sugerido que es posible incluso anticipar las consecuencias últimas de estadios avanzados de imposex (*i.e.* esterilidad) en base a las características del pertinente tracto genital masculino (Gibbs & Bryan 1996). Según estos autores, las especies de la familia Muricidae son propensas a la esterilidad porque en ellas tracto genital masculino y femenino ocupan el mismo lugar en la cavidad paleal, de modo que la imposición del primero impide el funcionamiento normal del segundo. El desarrollo de imposex en otros grupos (como los Nassariidae) no presentaría, sin embargo, consecuencias para su reproducción ya que ambos tractos genitales siguen trayectorias paralelas y el vaso deferente "impuesto" no llega a afectar a la papila genital. La universalidad de la anterior predicción ha sido no obstante puesta en duda por el hallazgo de hembras estériles, severamente afectadas por imposex, en las familias Nassariidae (Huet et al. 1995, Barreiro et al. 2001, Barroso et al. 2002), Buccinidae (Shi et al. 2005a), Cypraeidae o Conidae (Shi et al. 2005b). El presente trabajo, donde encontramos una hembra de *C. neritea* estéril y con imposex severo, amplía la lista de prosobranquios no murícidos donde el imposex parece restringir su potencial reproductivo. De modo similar a lo observado en *Nassarius reticulatus* (Nassariidae; Barreiro et al. 2001, Capítulo 1) y

Cantharus cecillei (Buccinidae; Shi et al. 2005a), el vaso deferente de este ejemplar parece introducirse en el canal ventral de la glándula de la cápsula. Sin embargo, no se detectó ninguna alteración externa del oviducto paleal o su apertura. Es posible pues que el mecanismo de esterilidad subyacente tenga su origen en alguna modificación interna del tracto genital femenino que impide la deposición de las cápsulas ya formadas (e.g. el examen de disecciones histológicas sugiere que la formación de cápsulas abortadas en *C. cecillei* podría deberse a un plegamiento de la pared interna de la glándula de la cápsula, Shi et al. 2005b).

Los valores de imposex registrados en *Nassarius reticulatus* en las mismas localidades durante la campaña del 2005 (Capítulo 1 de la presente memoria) son coherentes con lo inferido estudiando *Cyclope neritea*. La localidad más afectada también fue Poio, seguida de A Toxa y, finalmente, Vilagarcía. Lamentablemente, la comparación pormenorizada de los índices de imposex en ambos organismos no aporta una visión clara de la posible sensibilidad relativa ante la contaminación por TBT de cada especie. La incidencia de imposex fue consistentemente mayor en *N. reticulatus* (valor medio 100% frente a 91% en *C. neritea*). Sin embargo, el índice AOS fue mayor en *C. neritea* en las tres poblaciones (valor medio 0.33 versus 0.17 en *N. reticulatus*) mientras que VDSI y RPLI mostraron niveles relativos entre las dos especies variables según la localidad. En una misma localidad, especies distintas pueden estar expuestas a diferentes fuentes de TBT como consecuencia de diferencias en hábitat o dieta. Por ejemplo, se ha sugerido que los prosobranquios herbívoros suelen presentar factores de bioacumulación más bajos que los carnívoros debido al distinto grado de contaminación de sus alimentos (Bauer et al. 1997). Como *N. reticulatus* y *C. neritea* poseen hábitos similares (ambas especies son carroñeras y viven ligadas a un sustrato blando en el cuál permanecen enterradas largos periodos de tiempo), cabría esperar que estuviesen expuestas a niveles similares del contaminante. Sin embargo, este hecho no asegura que exhiban niveles similares de imposex pues su expresión dependerá sustancialmente de la fisiología de cada especie. La anterior situación puede complicarse introduciendo además la dimensión temporal. En un escenario de declive de la contaminación, las especies más longevas previsiblemente exhibirán más afectación pues sus poblaciones estarán integradas por

ejemplares que se desarrollaron en momentos más contaminados. Es más, aún asumiendo igual longevidad en ambas especies, cabe la posibilidad de que sus respectivas poblaciones estén representadas por un número distinto de cohortes; especialmente en las localidades donde *C. neritea* se ha asentado recientemente. Otra variable que podría intervenir en la comparación de ambas especies, de nuevo especialmente en las localidades donde *C. neritea* se ha asentado recientemente, es la condición original de los individuos introducidos (*i.e.* niveles de imposex en poblaciones nativas de la especie). Resulta necesario pues reunir más información sobre la respuesta de esta especie a la contaminación por TBT, y sobre su biología general, antes de poder utilizar sus poblaciones (nativas o introducidas) en estudios de biomonitorización.

Los datos obtenidos usando *Nassarius reticulatus* como biomonitor revelan una tendencia decreciente de la contaminación por TBT en A Toxa, Vilagarcía y Poio durante el periodo 2000–2005 (Capítulo 1). Que *Cyclope neritea* sea capaz de asentarse en localidades donde los niveles de TBT están descendiendo, pero aún son suficientemente elevados como para inducir imposex, podría aportar alguna clave sobre la reciente expansión de la especie en la región. La contaminación por TBT ha hecho desaparecer muchas poblaciones de gasterópodos en las pasadas décadas, particularmente en especies donde el imposex ocasiona esterilidad y que muestran baja capacidad de dispersión como *C. neritea* (*e.g.* *Nucella lapillus*, Gibbs & Bryan 1986). Cabe así la posibilidad de que el descenso de TBT en Galicia experimentado durante los últimos años haya favorecido el asentamiento y expansión de este gasterópodo (independientemente de sus causas últimas, *i.e.* proceso natural o actividades humanas). De hecho, el declive de las concentraciones ambientales de este contaminante se ha vinculado con el reciente establecimiento de un gasterópodo invasor (*Urosalpinx cinerea*, Muricidae) en la región holandesa de Oosterschelde (Faasse & Ligthart 2007), y el descenso de los niveles de TBT en la costa alemana del Mar Báltico se ha sugerido también como una de las posibles explicaciones a la reciente recolonización de dicha región por *N. reticulatus* (Nehring 2005).

5.2. ADN MITOCONDRIAL Y ORIGEN DE LAS POBLACIONES GALLEGAS DE *CYCLOPE NERITEA*

En un estudio anterior más amplio, Simon-Bouhet et al. (2006) encontraron que los linajes del gen COI de *Cyclope neritea* exhibían fuerte estructuración a lo largo del rango nativo de la especie. Los tres haplotipos más frecuentes (H1, H18 y H22) conformaban tres clados muy diferenciados, característicos de tres regiones geográficas distintas (i.e. Península Ibérica, Mediterráneo francés y Sicilia-Mar Adriático respectivamente; ver Fig. 7 y 8). Además, las poblaciones nativas mostraban niveles muy bajos de diversidad genética hasta el extremo de que la mayoría eran monomórficas o casi monomórficas. Cabría entonces esperar que las poblaciones del NO de la Península Ibérica presentasen haplotipos del clado de H1 si su origen es la expansión natural de la especie desde poblaciones nativas próximas, tal y como se ha sugerido para la costa atlántica francesa. Sin embargo, nuestros resultados rechazan claramente esta hipótesis en favor de un origen no nativo: (i) ninguno de los 90 individuos mostró un haplotipo del clado H1 o, incluso, haplotipos genealógicamente próximos a él, y (ii) los niveles de diversidad genética fueron elevados.

Las identidades y frecuencias haplotípicas registradas en las dos poblaciones gallegas más recientes (Vilagarcía y Poio) parecen reflejar las halladas por Simon-Bouhet et al. (2006) en poblaciones nativas de la región Véneto en el nordeste de Italia (dominancia de H22 y, en menor medida, de H16 y H17). Dicha región es el lugar de origen de una parte importante de las importaciones de almeja japonesas (*Tapes philippinarum*) hacia Galicia. Esas importaciones podrían ser fácilmente el vector fundamental de las introducciones más recientes de *Cyclope neritea* en el NO de la Península Ibérica. De hecho, es posible que sean el único vector de introducción ya que las dos poblaciones estudiadas por Simon-Bouhet et al. (2006) en la región Véneto mostraron niveles de diversidad genética inusualmente elevados para poblaciones nativas ($H=5-6$; $Hd=0.543-0.603$; $\pi=0.00769-0.01251$) pero razonablemente semejantes a los registrados por nosotros en las poblaciones gallegas. Por tanto, la alta diversidad genética medida en poblaciones gallegas podría haberse originado como resultado de un único evento de introducción a partir de una fuente altamente diversificada, y no necesariamente como resultado de introducciones recurrentes desde fuentes múltiples. De hecho, se ha sugerido una

explicación similar para explicar la presencia de *C. neritea* en algunas áreas de la costa atlántica francesa donde son frecuentes las importaciones de almeja japonesa desde la región del Véneto (Simon-Bouhet et al. 2006).

La población de A Toxa, si bien claramente introducida, presentó diferencias genéticas con las dos poblaciones más recientes. Sus haplotipos dominantes también son comunes en el Véneto y, además, encontramos dos secuencias genealógicamente divergentes (H33 y G2) de modo similar a lo registrado por Simon-Bouhet et al. (2006) en el nordeste de Italia (H28 y H29). Sin embargo, su composición haplotípica es significativamente diferente de la de las otras dos poblaciones gallegas, lo que sugiere una historia de introducción distinta. Esta localidad se sitúa en el área donde se detectó por primera vez una población permanente y moderadamente abundante de *Cyclope neritea* hace más de una década (Rolán 1992). Obviamente, no podemos demostrar que los ejemplares analizados en este estudio descendan de esa población pionera. Sin embargo, cabe la posibilidad de que la especie haya estado presente en A Toxa durante un periodo de tiempo mayor que en las otras dos localidades. De ser así, esa población podría ser resultado de una introducción diferente o, incluso, haber experimentado varias introducciones durante este periodo. De hecho, el origen de la población de A Toxa se ha vinculado al transporte de ostra desde la laguna de Venecia (Rolán et al. 1985, Rolán 1992) y no a las importaciones de almeja japonesa identificadas como vector más probable de las introducciones de Vilagarcía y Poio. Con independencia de su origen preciso, la composición genética distinta de A Toxa rechaza que la causa más probable de la actual proliferación de la especie en las costas gallegas sea la expansión desde esa introducción inicial a principios de la década de 1990. *C. neritea* carece de larva planctónica (Gomoiu 1964) y se asume que posee una capacidad de dispersión reducida. Además, cualquier hipotética expansión dentro de la región debería haber favorecido la ocurrencia de nuevas poblaciones genéticamente similares. Sin embargo, la población de A Toxa mostró una diferenciación genética significativa frente a las otras dos localidades, a pesar de estar situada a medio camino entre ambas.

Las potenciales consecuencias de esta invasión son aún inciertas (Bachelet et al. 2004), si bien es cierto que *Cyclope neritea* se considera una “molestia” en los bancos de cultivo de almeja donde la especie ha alcanzado densidades excepcionalmente elevadas (*obs. pers.*). La conclusión de que *C. neritea* ha proliferado recientemente dentro de las costas del NO de la Península Ibérica como consecuencia del transporte mediado por el hombre implicaría que cualquier medida hipotética de control de este gasterópodo debería centrarse en impedir nuevas reintroducciones tanto desde poblaciones nativas de la especie como desde las áreas ya infectadas en Galicia.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
- Bachelet G, Simon-Bouhet B, Desclaux C, García-Meunier P, Mairesse G, de Montaudouin X, Raigné H, Randriambao K, Sauriau P-G, Vilard F (2004) Invasion of the eastern Bay of Biscay by the nassariid gastropod *Cyclope neritea*: origin and effects on resident fauna. *Mar Ecol Prog Ser* 276: 147-159
- Barreiro R, González R, Quintela M, Ruiz JM (2001) Imposex, organotin bioaccumulation and sterility of female *Nassarius reticulatus* in polluted areas of NW Spain. *Mar Ecol Prog Ser* 218: 203-212
- Barroso CM, Moreira MH, Bebianno MJ (2002) Imposex, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* (L.) from the Portuguese coast. *Mar Ecol Prog Ser* 230: 127-135
- Bauer B, Fioroni P, Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J, Kalbfus W (1997) The use of *Littorina littorea* for tributyltin (TBT) effect monitoring-results from the German TBT survey 1994/1995 and laboratory experiments. *Environ Pollut* 96: 299-309
- Carlton JT (1992) Introduced marine and estuarine mollusks of North America: an end-of-the-20th-century perspective. *J Shellfish Res* 11: 489-505
- Carlton JT (1996) Biological invasions and cryptogenic species. *Ecology* 77: 1653-1655
- Carlton JT, Geller JB (1993) Ecological roulette: the global transport of nonindigenous marine organisms. *Science* 261: 78-82
- Censky EJ, Hodge K, Dudley J (1998) Over-water dispersal of lizards due to hurricanes. *Nature* 395: 556
- Clergeau P, Yésou P (2006) Behavioural flexibility and numerous potential resources of introduction for the sacred ibis: causes of concern in western Europe? *Biological Invasions* 8: 1381-1388
- Colautti RI, Bailey SA, Van Overdijk CDA, Amundsen K, MacIsaac HJ (2006) Characterised and Projected Costs of Nonindigenous Species in Canada. *Biological Invasions* 8: 45-59
- Daehler CC, Strong DR (1997) Hybridization between introduced smooth cordgrass (*Spartina alterniflora*; Poaceae) and native California cordgrass (*S. foliosa*) in San Francisco Bay, California, USA *Am J Bot* 84: 607-611
- Estoup A, Largiadere CR, Perrot E, Chourrout D (1996) Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Mol Mar Biol Biotech* 5: 295-298
- Faasse M, Ligthart M (2007) The American oyster drill, *Urosalpinx cinerea* (Say, 1822), introduced to The Netherlands-increased risks after ban on TBT? *Aquatic Invasions* 2: 402-406

- Geller JB, Walton ED, Grosholz ED, Ruiz GM (1997) Cryptic invasions of the crab *Carcinus* detected by molecular phylogeography. *Mol Ecol* 6: 901-906
- Gibbs PE, Bryan GW (1986) Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. *J Mar Biol Ass U K* 66: 767-777
- Gibbs PE, Bryan GW (1996) TBT-induced imposex in neogastropod snails: masculinization to mass extinction. In: de Mora SJ (ed) *Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant*. Cambridge University Press, Cambridge, p 212-236
- Gomoïu MT (1964) Biologisches Studium der Arten *Nassa reticulata* (L.) und *Cyclonassa neritea* (L.) im schwarzen Meer (rumänischer Küstenbereich) *Revue Roumaine de Biologie Série de Zoologie* 9: 39-49
- Grosholz ED (2002) Ecological and evolutionary consequences of coastal invasions. *Trends Ecol Evol* 17: 22-27
- Hidalgo JG (1917) Fauna malacológica de España, Portugal y las Islas Baleares. *Trab Mus Nac Cie Nat* 30: 1-752
- Hochberg Y (1974) Some generalizations of the T-method in simultaneous inference. *Journal of Multivariate Analysis* 4: 234-244
- Huet M, Fioroni P, Oehlmann J, Stroben E (1995) Comparison of imposex response in three prosobranch species. *Hydrobiologia* 309: 29-35
- Lewis PN, Hewitt CL, Riddle M, McMinn A (2003) Marine introductions in the Southern Ocean: an unrecognised hazard to biodiversity. *Mar Pollut Bull* 46: 213-223
- Mack MC, D'Antonio CM (1998) Impacts of biological invasions on disturbance regimes. *Trends Ecol Evol* 13: 195-198
- Nehring S (2005) Re-occurrence and bioindication status of the netted dog whelk *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758) in the Western Baltic Sea (Mecklenburg Bight, Germany). *Russ J Mar Biol* 31: 14-20
- Quintela M, Couceiro L, Ruiz JM, Barreiro R (2006) Discovery of imposex in the gastropod *Cyclope neritea* now invading Galicia (north-west Spain). *J Mar Biol Ass UK* 86: 1171-1173
- Rolán E (1992) Dos especies más de moluscos mediterráneos introducidos en la bahía de O Grove. *Thalassas* 10: 135
- Rolán E, Trigo J, Otero-Schmitt J, Rolán - Álvarez E (1985) Especies implantadas lejos de su área de distribución natural. *Thalassas* 3: 29-36
- Román-Muñoz A, Real R (2006) Assessing the potential range expansion of the exotic monk parakeet in Spain. *Diversity and Distributions* 12: 656-665
- Ruiz JM, Quintela M, Barreiro R (1998) Ubiquitous imposex and organotin bioaccumulation in gastropods *Nucella lapillus* (L.) from Galicia (NW Spain): A possible effect of nearshore shipping. *Mar Ecol Prog Ser* 164: 237-244
- Sauriau P-G (1991) Spread of *Cyclope neritea* (Mollusca: Gastropoda) along the northern-eastern Atlantic coasts in relation to oyster culture and to climatic fluctuations. *Mar Biol* 109: 299-309

- Shi H, Huang C, Yu X, Zhu S (2005a) An updated scheme of imposex for *Cantharus cecillei* (Gastropoda: Buccinidae) and a new mechanism leading to the sterilization of imposex-affected females. *Mar Biol* 146: 717-723
- Shi H, Huang CJ, Zhu SX, Yu XJ, Xie WY (2005b) Generalized system of imposex and reproductive failure in female gastropods of coastal waters of mainland China. *Mar Ecol Prog Ser* 304: 179-189
- Simon-Bouhet B, Garcia-Meunier P, Viard F (2006) Multiple introductions promote range expansion of the mollusc *Cyclope neritea* (Nassariidae) in France: evidence from mitochondrial sequence data. *Mol Ecol* 15: 1699-1711
- Smith BS (1980) The estuarine mud snail, *Nassarius obsoletus*: abnormalities in the reproductive system. *J Molluscan Stud* 46: 247-256
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882
- Van der Velde G, Rajagopal S, Kuyper-Kollenaar M, Bij de Vaate A, Thieltges D, MacIsaac HJ (2006) Biological Invasions: Concepts to Understand and Predict a Global Threat. In: Bobbink R, Beltman B, Verhoeven JTA, Whigham DF (eds) *Wetlands: Functioning, Biodiversity Conservation, and Restoration*, Vol 2. Springer Berlin Heidelberg, p 61-90
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506-513

C 5

A

P

I

T

U

L

O



CAPÍTULO 5: *DNA BARCODING* EN DOS ESPECIES MORFOLÓGICAMENTE SIMILARES DEL GÉNERO *NASSARIUS* DUMÉRIL: *NASSARIUS RETICULATUS* (L.) Y *NASSARIUS NITIDUS* (JEFFREYS)

1. INTRODUCCIÓN

2. OBJETIVOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y OBTENCIÓN DE SECUENCIAS COI EN *NASSARIUS NITIDUS*

3.2. ANÁLISIS DE DATOS

4. RESULTADOS

4.1. VARIACIÓN INTRA E INTERESPECÍFICA

4.2. LUGARES DE RESTRICCIÓN DIAGNÓSTICO

5. DISCUSIÓN

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. INTRODUCCIÓN

Especies crípticas se refiere a dos o más especies distintas clasificadas erróneamente bajo el nombre de una única especie como consecuencia de su elevada similitud morfológica (Bickford et al. 2006). Estas incertidumbres taxonómicas pueden tener implicaciones prácticas importantes: estimas de biodiversidad (Hebert et al. 2004), planes de conservación (Stuart et al. 2006), gestión de pesquerías (Borsa 2002), biomonitorización (Lobel et al. 1990) o control de vectores infecciosos (Besansky 1999), plagas (Wang et al. 1998) y especies invasoras (Geller et al. 1997). Afortunadamente, las nuevas técnicas moleculares proporcionan herramientas poderosas para detectar e identificar especies crípticas. De hecho, los estudios con estas especies se han incrementado exponencialmente en las últimas décadas (Bickford et al. 2006). Tales estudios muestran que su presencia es ubicua en el medio marino habiéndose registrado en la mayoría de los hábitats conocidos desde los polos hasta los trópicos y afectando a una amplia variedad de grupos taxonómicos (Knowlton 1993, 2000). Su relativa abundancia en el medio marino se ha relacionado con dos hechos principalmente (Knowlton 1993): (i) nuestra menor accesibilidad a estos hábitats; y (ii) la hegemonía de procesos de especiación vinculados a otros aspectos fenotípicos no morfológicos como los sistemas de reconocimiento químico.

Nassarius reticulatus (Linnaeus, 1758) "sensu lato" es un gasterópodo común a lo largo de las costas atlánticas y mediterráneas de Europa y África, incluyendo los archipiélagos de Canarias y Azores (Rolán & Luque 1994). Las poblaciones de este nasárido exhiben cierta variación morfológica y el estatus taxonómico de los distintos morfotipos ha sido objeto de considerable debate durante más de un siglo (revisado en Rolán & Luque 1994). Algunos de los primeros autores distinguieron dos especies distintas dentro del complejo *Nassarius reticulatus*: *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758) "sensu stricto" y *Nassarius nitidus* (Jeffreys, 1867). Pese a que dicha distinción fue ratificada en la segunda mitad del

S.XX por medio de diferencias bioquímicas (Collyer 1961), el consenso taxonómico ha seguido reconociendo un único taxón hasta principios de la década de 1990 (e.g. Fretter & Graham 1985), momento en el que se establece la validez de ambas especies tanto analizando diferencias morfológicas y ecológicas en poblaciones simpátricas (Rolán & Luque 1994) como mediante el hallazgo de diferencias genéticas significativas para distintos *loci* enzimáticos (Sanjuán et al. 1997). Más recientemente, las diferencias entre ambas especies han sido ratificadas mediante métodos de geometría morfométrica (Carvajal - Rodríguez et al. 2006). A pesar de esas diferencias, sigue siendo complicado distinguir ambos taxa por medio de su morfología. Así, los caracteres conchológicos permiten adscribir los individuos con relativa facilidad a una u otra especie bajo condiciones óptimas (Tabla 1) pero esta tarea puede verse enormemente dificultada cuando las conchas están erosionadas, colonizadas por epibiontes, o cuando las poblaciones exhiben cierta variabilidad intraespecífica (Fig. 1). En cuanto a la geometría morfométrica, si bien constituye una aproximación más objetiva, las pruebas de validación indican que no garantiza la asignación correcta de los individuos a su especie en el 100% de los casos (Carvajal-Rodríguez et al. 2006). Por otra parte, ninguna de estas técnicas parece permitir la identificación correcta de fases juveniles.

Carácter	<i>Nassarius reticulatus</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Nassarius nitidus</i> (Jeffreys, 1867)
Coloración de la concha	Crema	Violácea
Coloración interna de la apertura	Blanca	Violácea
Callo columelar	Blanco	Traslúcido
Costillas axiales en la última vuelta	20.09 \pm 1.94 (n=30)	15.21 \pm 1.55 (n=30)
Cordones espirales en la última vuelta	12-14	11-13
Nº estrías en el canal sifonal	4-5	3
Perfil de la espira	Casi rectilíneo	Ligeramente convexo
Ángulo apical	55.68° \pm 5.51 (n=30)	48.48° \pm 5.69 (n=30)
Sutura	Poco marcada	Algo escalonada
Perfil del labio externo	Con doble ondulación	Sin doble ondulación
Curvatura del labio externo	Parte superior rectilínea	Curvada uniformemente
Dientes del labio externo	Desiguales, uno central prominente	Por lo general iguales

Tabla 1.- Diferencias conchológicas entre *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758) y *Nassarius nitidus* (Jeffreys, 1867). Adaptado de Rolán & Luque (1994).

Tras un estudio pormenorizado de colecciones y poblaciones naturales, Rolán & Luque (1994) concluyeron que *Nassarius reticulatus* s.s. es una especie típicamente atlántica, habiéndose encontra-

do desde la fachada occidental de las Islas Británicas y Canal de la Mancha hasta el Estrecho de Gibraltar, norte de Marruecos y archipiélago canario. En el Mediterráneo, *N. reticulatus* penetraría, al menos en la orilla europea, hasta el Golfo de León. Por su parte, *Nassarius nitidus* tendría un rango de distribución mucho mayor. Estaría ampliamente distribuida por todo el Mediterráneo y Mar Negro. También aparecería a lo largo de las costas atlánticas de la Península Ibérica y Francia en simpatria con *N. reticulatus*, si bien en este caso su presencia se limitaría al interior de estuarios (e.g. estuarios del Orwell y Támesis en el Reino Unido, Rías de Ferrol y Vigo en el NO España, o estuarios de Aveiro y Faro en Portugal). Dentro de este amplio rango de distribución, Rolán & Luque (1994) distinguieron tres morfotipos vinculados, un tanto laxamente, a tres grandes regiones geográficas (Mediterráneo Oriental-Mar Negro, Mediterráneo Occidental-Península Ibérica, y Golfo de Vizcaya-Canal de la Mancha) (Fig. 2). El registro más septentrional recopilado por estos autores corresponde a Zealand, Países Bajos. Sin embargo, es probable que *N. nitidus* sea la única de las dos especies presente en el Mar del Norte, alcanzando incluso las costas noruegas (Hansson 1998). De hecho, en las costas holandesas hay registros fósiles del penúltimo (Eemiense) ciclo interglacial pero en esos mismos depósitos no se ha encontrado *N. reticulatus* (Dekker 2004). Desde el año 2000, ambas especies experimentan una gran explosión demográfica en aguas costeras holandesas (Craeymeersch & Rietveld 2005).

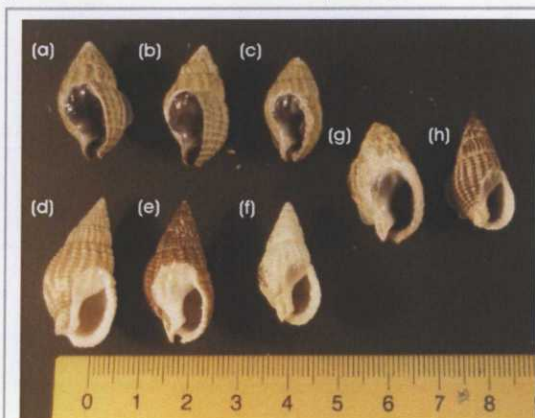
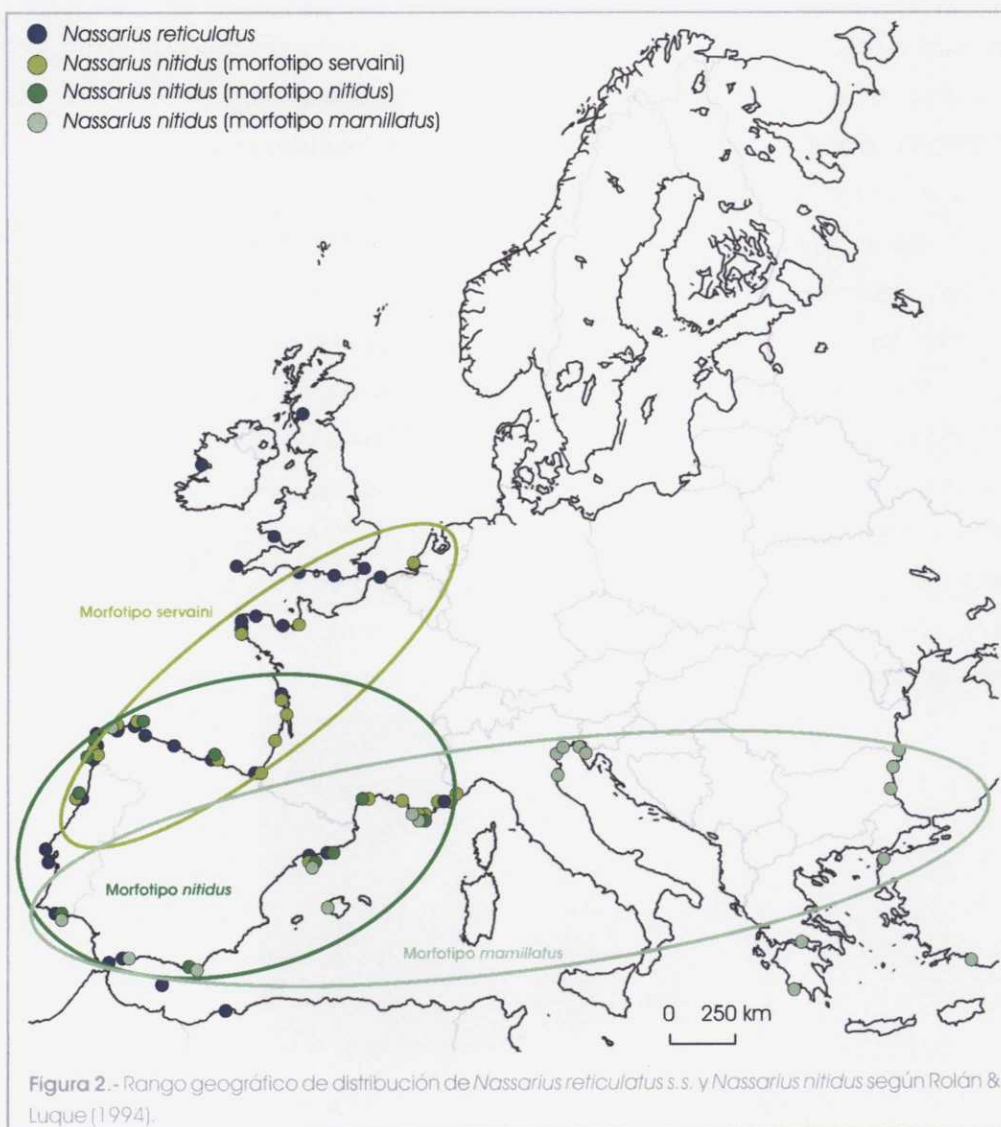


Figura 1.- Morfología típica de la concha en *Nassarius nitidus* (a-c) y *Nassarius reticulatus* (d-f); (g-h) muestran rasgos característicos de las dos especies.



2. OBJETIVOS

Desde que Stroben et al. (1992a, 1992b) publicaran la primera descripción detallada del imposter en *Nassarius reticulatus*, este organismo ha sido utilizado frecuentemente en estudios de biomonitorización de tributilo de estaño (TBT). De hecho, esta especie está entre las recomendadas en los programas de monitorización de compuestos organoestánicos promovidos por la Convención OSPAR (*Convention for the Protection of the Maritime Environment of the North-East Atlantic*, www.ospar.org). Los estudios de biomonitorización se basan en una respuesta especie-específica al contaminante; por tanto, es fundamental identificar correctamente la especie bioindicadora. Por otra parte, las incertidumbres taxonómicas antes descritas siguen entorpeciendo la correcta comprensión del rango geográfico de distribución de cada una de las dos especies. Este conocimiento es importante hoy día al haberse detectado en los últimos años cambios de abundancia y distribución considerables (Craeymeersch & Rietveld 2005).

Vistas las dificultades para discriminar los individuos de estas dos especies gemelas de *Nassarius* con métodos taxonómicos convencionales (Rolán & Luque 1994) o con técnicas de geometría morfológica (Carvajal-Rodríguez et al. 2006), en el presente trabajo investigamos la posibilidad de usar secuencias mitocondriales del gen Citocromo c Oxidasa Subunidad I (COI) como herramienta de diagnóstico taxonómico alternativa. Además, sondeamos la posibilidad de diseñar un método sencillo y económico para usar dicha aproximación de manera rutinaria por medio de mapas de restricción. Para ello, analizamos el grado de divergencia entre *Nassarius reticulatus* y *Nassarius nitidus* en varias poblaciones europeas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y OBTENCIÓN DE SECUENCIAS COI EN *NASSARIUS NITIDUS*

Se recogieron 25 individuos de *Nassarius nitidus* en Venecia (Italia), localidad característica de su rango geográfico. Además, se incluyeron también otros ejemplares de la especie procedentes de varias localidades del litoral atlántico europeo: Rianxo (NO España, n=3); Santoña (N España, n=3); Oostende (Bélgica, n=4) y Lysekil (Suecia, n=1). Los individuos se capturaron a mano o utilizando nasas, siempre con la ayuda de un cebo, y se enviaron vivos al laboratorio en el menor tiempo posible.

Los procedimientos destinados a la obtención de secuencias mitocondriales del gen COI en esta especie fueron idénticos a los detallados para *Nassarius reticulatus* en el Capítulo 3. Brevemente:

1. Tras romper la concha, se escindió el pie para luego lavarlo con agua destilada y conservarlo en etanol 96°.
2. Se extrajo el ADN del anterior tejido utilizando una disolución de Chelex-100 (*Bio-Rad Laboratories*, Hércules, CA, EE.UU.) (Walsh et al. 1991, Estoup et al. 1996).
3. Se amplificó un fragmento de 710 bp del gen mitocondrial COI utilizando los cebadores universales descritos por Folmer et al. (1994). La reacción de PCR se llevó a cabo en 25 µl con 0.5 µM de cada cebador, 0.2 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0.4 U de ADN Taq polimerasa, tampón de PCR 1x, 1 µl del extracto de ADN y agua desionizada (Milli-Q) estéril. Las amplificaciones se llevaron a cabo con el perfil: 2 min a 95 °C; 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 45 °C y 1 min a 72 °C.
4. Las reacciones se comprobaron por electroforesis en gel de agarosa 1.5% en tampón TBE. Los productos de PCR se purificaron con las enzimas *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) y *Exonuclease I* (Exo) (*Amersham Pharmacia Biotech Inc.*, Piscataway, NJ, EE.UU.).

5. Finalmente, las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con el preparado comercial *CEQ™ DTCS Quick Start Kit* (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.). Las muestras se precipitaron en etanol y se procedió a su lectura en un secuenciador automático *Beckman Coulter CEQ 8000 Genetic Analysis System* (Beckman Coulter).

3.2. ANÁLISIS DE DATOS

Los cromatogramas de las 36 secuencias nucleotídicas de *Nassarius nitidus* se revisaron con el programa *ChromasPro* (www.technelysium.com) eliminando las secciones de fiabilidad dudosa (i.e. extremos). Las secuencias se alinearon con las derivadas del estudio de 6 poblaciones atlánticas de *Nassarius reticulatus* (Capítulo 3) utilizando el software *ClustalX* (Thompson et al. 1997) para identificar la región estudiada en esta última especie (fragmento de 395 bp) y comparar ambos conjuntos de datos.

La diversidad genética de la población de Venecia se caracterizó utilizando las medidas clásicas para datos haplotípicos proporcionadas por el software *DnaSP ver. 4* (Rozas et al. 2003): número de lugares polimórficos (S), número total de haplotipos (Ht), número de haplotipos únicos (Hu), índice de diversidad haplotípica (Hd) e índice de diversidad nucleotídica (π). Este software se utilizó también para identificar los haplotipos presentes en las otras poblaciones de la especie (litoral atlántico europeo). Las relaciones genealógicas entre haplotipos se estimaron con el programa *Network 4.1.1.2.* (Fluxus Engineering Suffolk, UK) utilizando el algoritmo *median joining* (Bandelt et al. 1999). La divergencia molecular entre *Nassarius reticulatus* y *Nassarius nitidus* se cuantificó con el software *MEGA ver. 4.0* (Tamura et al. 2007) calculando el número de diferencias nucleotídicas entre haplotipos y representando gráficamente sus resultados (*mismatch distribution*); además, se calcularon las distancias genéticas medias (*Kimura 2-parameters*, Kimura 1980) intra e interespecíficas. Siguiendo a Wood et al. (2007), la distancia interespecífica *K-2P* neta se convirtió en tiempos de divergencia aplicando el rango de tasas publicadas de divergencia del gen COI en moluscos: valor mínimo 0.7% por Ma para

bivalvos ácidos (Marko 2002) y valor máximo 2.4% por Ma para gasterópodos tróquidos (Hellberg & Vacquier 1999).

Con el objetivo de proporcionar un método sencillo y económico para identificar rutinariamente ambas especies, se simularon digestiones de sus secuencias consenso con múltiples enzimas de restricción utilizando el programa *CLC Free Workbench* (www.clcbio.com). Las simulaciones se llevaron a cabo siguiendo el orden de popularidad establecido en dicho programa para las distintas enzimas y se detuvieron con la primera enzima que produjo un resultado positivo (*i.e.* enzima que corta en uno o más lugares sólo la secuencia de una de las especies).

4. RESULTADOS

4.1. VARIACIÓN GENÉTICA INTRA E INTERESPECÍFICA

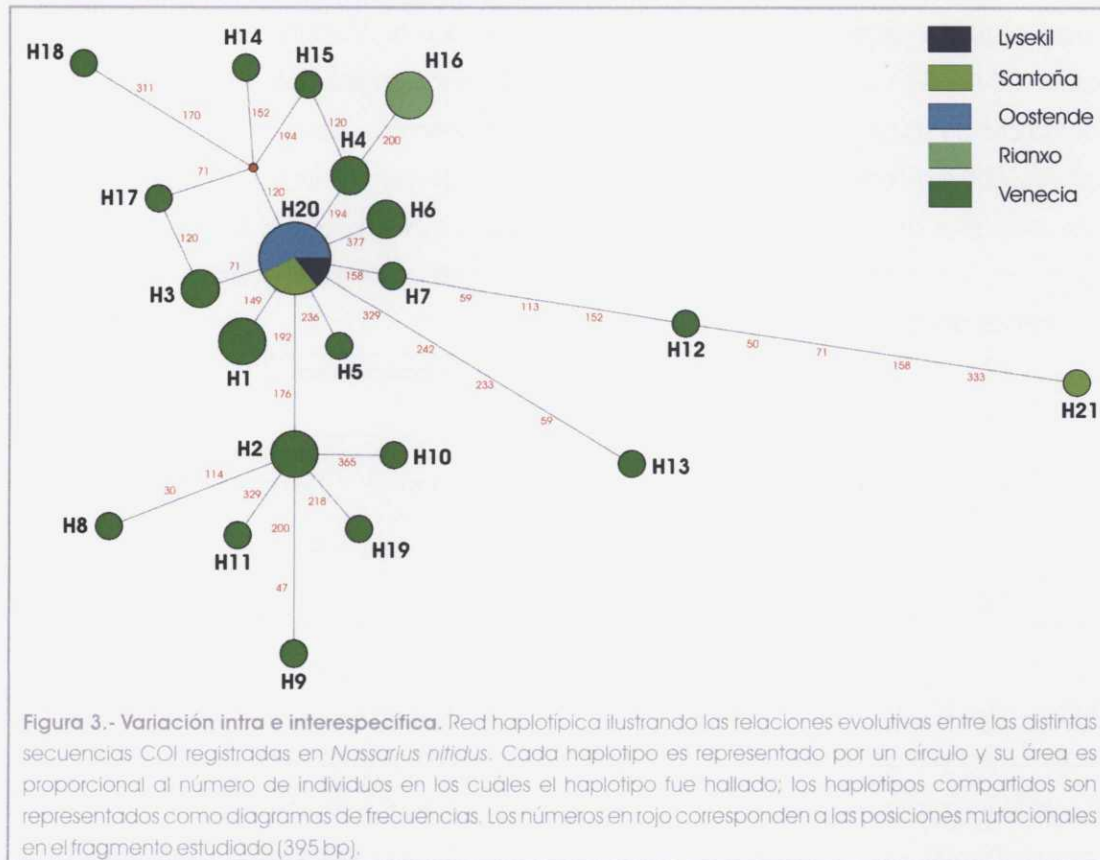
Nassarius nitidus exhibió una diversidad genética elevada en Venecia. El número de lugares polimórficos fue 23 (~6%); se identificaron 18 haplotipos, 13 de los cuáles aparecieron en un único individuo; y los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica tomaron valores de 0.970 (± 0.020) y 0.0091 (± 0.0009) respectivamente. En la Tabla 2 se comparan estas estimas con las obtenidas en 6 poblaciones de *Nassarius reticulatus* estudiadas con un esfuerzo de muestreo similar (22-27 individuos) (Capítulo 3); la diversidad genética en *N. nitidus* fue considerablemente superior a la registrada en cualquiera de las poblaciones de *N. reticulatus*.

	Estimas de diversidad genética				
	S	Ht	Hu	Hd	π
<i>Nassarius reticulatus</i>	6-16	7-14	1-8	0.641-0.849	0.0023-0.0041
<i>Nassarius nitidus</i>	23	18	13	0.970	0.0091

Tabla 2.- Variación intra e interespecífica. Comparación de estimas de diversidad genética en dos especies del género *Nassarius*: número de lugares polimórficos (S), número total de haplotipos (Ht), número de haplotipos únicos (Hu) e índices de diversidad haplotípica (Hd) y nucleotídica (π).

Ninguno de los haplotipos presentes en Venecia apareció en las poblaciones atlánticas de *Nassarius nitidus*. En estas localidades se identificaron 3 nuevas secuencias. Una estuvo presente en los 3 individuos de Rianxo; otra fue compartida por los 4 individuos de Oostende, 2 individuos de Santoña y el individuo de Lysekil; y la tercera apareció en el otro ejemplar de Santoña. De esta manera, pese a que el número de individuos estudiados en *N. nitidus* fue relativamente bajo (36 frente a los 156 de *Nassarius reticulatus*), se obtuvo un número de haplotipos considerable (21 frente a 36). Las relaciones

genealógicas entre los 21 haplotipos (GenBank Accession Numbers: EF571481–EF571499, EU428828, EU623457) se ilustran en la Figura 3. Es posible intuir una morfología en estrella, aunque menos conspicua que la de *N. reticulatus* (Fig. 4 en Capítulo 3). Los haplotipos H2 (3 individuos de Venecia) y H20 (2 individuos de Santoña, 4 individuos de Oostende, 1 individuo de Lysekil) están separados por dos pasos mutacionales y ocupan una posición central en la red; la mayoría de los restantes haplotipos están íntimamente relacionados con los dos anteriores (1-3 pasos mutacionales).



Las secuencias COI mostraron gran divergencia entre especies (Fig. 4). El número de diferencias nucleotídicas entre pares de haplotipos de la misma especie osciló entre 1 y 10 mientras que este

rango fue de 33 a 45 para los pares constituidos por haplotipos de una y otra especie (Fig. 5). La distancia genética media intraespecífica ($K-2P$) mostró en ambos organismos un valor próximo a 0.01 (0.008 en *Nassarius reticulatus* y 0.011 en *Nassarius nitidus*) pero dicho valor fue un orden de magnitud mayor (0.096) para la distancia interespecífica neta. Aplicando el rango de tasas de divergencias del gen COI en moluscos más amplio hallado en la literatura (*i.e.* 0.7%–2.4% por Ma) dicha distancia interespecífica neta sugiere que la separación de ambas especies tuvo lugar hace 4.0–13.7 millones de años, aproximadamente durante la segunda mitad del Mioceno (5–26 Ma).

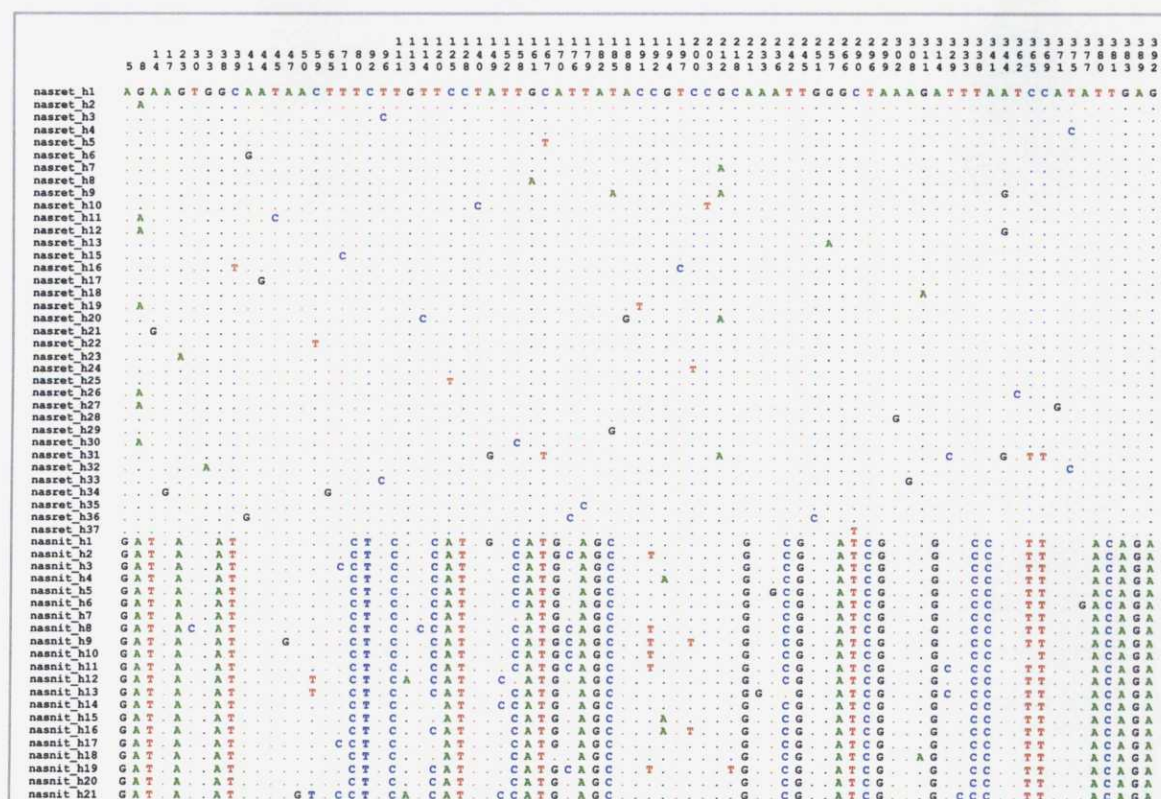
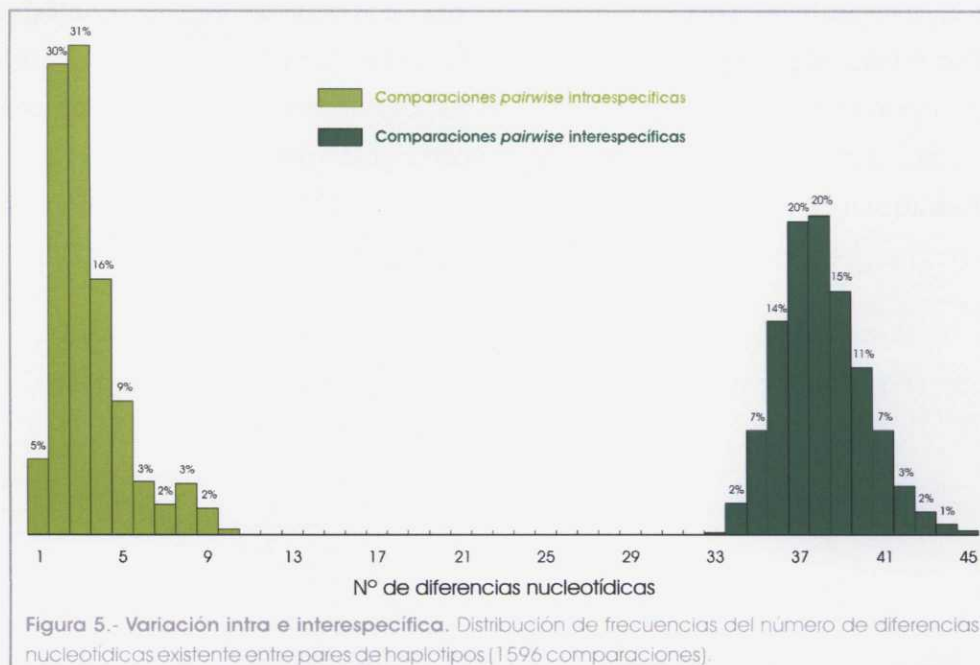


Figura 4.- Variación intra e interespecífica. Diferencias entre los haplotipos registrados en *Nassarius reticulatus* (nasret_h1-nasret_h37) y *Nassarius nitidus* (nasnit_h1-nasnit_h21). Únicamente se indican las posiciones polimórficas en el fragmento estudiado (395 bp).



4.2. LUGARES DE RESTRICCIÓN DIAGNÓSTICO

Las simulaciones de digestión de las secuencias consenso de las dos especies revelaron que la enzima *DdeI* podría diferenciar fácilmente ambos taxa. Esta enzima reconoce la secuencia CTNAG, ausente en todos los haplotipos de *Nassarius nitidus* pero presente en los de *Nassarius reticulatus* en las posiciones 128-132 y 218-222 (Fig. 6). En consecuencia, la digestión del fragmento estudiado con esta enzima generaría 3 productos de distinto tamaño, todos ellos menores de 250 bp, en *N. reticulatus* y un único producto más grande en *N. nitidus*.

	5	15	25	35	45
nasret	CTATAAT	TGGAGGATT	GGGAATTGGT	TAGTTCCGCT	AATATTAGGA
nasnit	CTATGATAAT	TGGTGGATT	GGAAATTGGT	TAGTTCCATT	AATATTAGGA
	55	65	75	85	95
nasret	GCTCCTGACA	TAGCTTTTCC	TCGATTAAAT	AATATAAGTT	TCTGAYTACT
nasnit	GCTCCTGAYA	TAGCTTTTCC	YCGATTAAAC	AATATAAGTT	TTTGATTACT
	105	115	125	135	145
nasret	TCCTCCTGCT	TTGTTACTTT	TACTCTCTC	AGCTGCAGTT	GAGAGAGGAG
nasnit	TCCTCCTGCT	CTRTTACTTY	TACTATCTC	AGCTGCAGTT	GAGAGAGGRG
	155	165	175	185	195
nasret	TTGGAAC	TGGGTGAACCGTA	TACCCCTCCTC	TATCTGCAAA	CCTGGCTCAC
nasnit	TYGGAAC	YGGATGAACGTG	TACCCYCCAC	TGTCCGCAAA	CYTRGCTCAC
	205	215	225	235	245
nasret	GCCGGTGGTT	CGGTTGACTT	AGCTATTTTT	TCATTACATC	TTGCTGGTGT
nasnit	GCCGGTGGTT	CGGTTGACTT	GGCTATTTTT	TCATTACATC	TCGCGGGTGT
	255	265	275	285	295
nasret	GTCCTTCGATT	TTAGGGGCTG	TAAATTTTAT	TACAACATATC	ATTAATATAC
nasnit	GTCCTTCGATT	TTAGGAGCTG	TAAATTTTAT	TACAACATAT	ATTAACATGC
	305	315	325	335	345
nasret	GATGACGAGG	GATACAATTT	GAGCGCTTC	CTTTATTGTT	ATGATCTGTA
nasnit	GATGACGAGG	GATGCAATTT	GAGCGCTYC	CTTTATTCGT	CTGATCTGTA
	355	365	375	385	395
nasret	AAAATTACTG	CTATCCTACT	ACTTTTATCT	TTGCCTGTAT	TGGCA
nasnit	AAAATTACTG	CTATTCTATT	ACTTTTTRTCA	CTACCTGTGT	TAGCA

Figura 6.- Lugares de restricción diagnóstico. Alineamiento de las secuencias consenso de *Nassarius reticulatus* (nasret) y *Nassarius nitidus* (nasnit) mostrando el fragmento de reconocimiento y corte de la enzima de restricción *DdeI* (CNTAG).

5. DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que las secuencias parciales del gen COI sirven para diferenciar inequívocamente estas dos especies de *Nassarius*. Las distancias genéticas inferidas con este marcador sugieren que ambos taxa se han separado hace al menos 4.0 Ma o tan temprano como 13.7 Ma, valores ambos consistentes con los análisis filogenéticos de la familia (Haas 2000) y el registro fósil (Gili & Martinell 1994, Gili et al. 1995). Para nuestros objetivos, lo interesante de esta gran diferenciación es que garantiza la identificación inequívoca de cada especie al no existir solapamiento entre la variabilidad intraespecífica y las diferencias entre especies. De hecho, nuestros niveles de divergencia son similares, o incluso superiores, a los registrados en otras especies crípticas de gasterópodos (Collin 2000, Wilke et al. 2000, Pfenninger et al. 2003).

El uso de marcadores moleculares como herramienta de diagnóstico taxonómico tiene larga tradición (Avice 1994). En particular, las secuencias COI han experimentado un gran impulso desde que Hebert et al. (2003a) introdujeron el concepto de *DNA barcode*, existiendo ya un consorcio internacional de organizaciones (*Consortium for the Barcoding of Life*, CBOL, www.barcoding.si.edu/) para estimular su implementación a nivel mundial (Savolainen et al. 2005). La premisa principal de esta aproximación es la posibilidad de identificar todas las especies animales utilizando un fragmento de 650 bp del gen COI. Así, de modo análogo a los códigos de barras de los productos comerciales, estos *DNA barcodes* servirían como herramienta estándar para identificar de modo rápido, simple y robusto las especies animales. Pese a que nosotros usamos un fragmento más corto que el recomendado en los protocolos de *barcode* (395 bp), éste permitió una discriminación clara entre los dos taxa. De hecho, otros autores han demostrado la utilidad de fragmentos todavía más cortos (<200 bp) cuando se trabaja con especies de un mismo grupo taxonómico (Hajibabaei et al. 2006, Robins

et al. 2007). El uso de un fragmento más corto tiene la ventaja de reducir costes (suele necesitarse una única reacción de secuenciación). Además, un fragmento más corto aumenta la probabilidad de obtener reacciones de PCR con éxito en muestras mal conservadas o deterioradas (Hughey et al. 2001), tal y como hemos comprobado nosotros mismos con algunas de nuestras muestras de *N. reticulatus* usadas en un trabajo anterior (Capítulo 3). A pesar de su menor longitud, nuestro fragmento proporciona estimas de divergencia interespecífica coherentes con las encontradas en otros grupos taxonómicos; el análisis de 13320 pares de especies congéneres representativos de 11 *phyla* reveló una divergencia superior al 8% en el 79% de los pares estudiados (Hebert et al. 2003b).

Nuestro método representa una alternativa o complemento a las dos herramientas de diagnóstico disponibles actualmente para diferenciar estas mismas especies: la aproximación taxonómica convencional basada en rasgos morfológicos (Rolán & Luque 1994) y el empleo de técnicas de geometría morfométrica (Carvajal - Rodríguez et al. 2006). Frente a ellas, las secuencias COI presentan la ventaja de su infalibilidad, la capacidad para aportar datos útiles no sólo en el diagnóstico de especies sino también en estudios filogeográficos, y la posibilidad de identificar muestras de condición y origen muy diverso (fragmentos de tejido, individuos con conchas en mal estado, puestas o fases juveniles). Entre sus limitaciones, las secuencias COI constituyen posiblemente una aproximación más exigente y costosa desde el punto de vista técnico, si bien el coste en tiempo/dinero se reduce drásticamente para tamaños de muestra moderados o grandes. Este coste puede reducirse todavía más si, en vez de trabajar con datos de secuencias, se emplea una alternativa basada en enzimas de restricción como la propuesta por nosotros. Por otra parte, la técnica utilizada en el presente estudio para recoger muestras de ADN supone la muerte de los individuos. No obstante, existe la posibilidad (no ensayada por nosotros) de usar técnicas de muestreo no destructivas probadas con éxito en otros moluscos marinos (Palmer et al. 2008).

La discriminación inequívoca de estas dos especies de *Nassarius* puede ser útil en distintos aspectos de ecología básica y aplicada. Una correcta identificación taxonómica es fundamental en especies que, como *Nassarius reticulatus*, se usan como biomonitores (e.g. Sturmbauer et al. 1999).

Pese a que el carácter de especies distintas y verdaderas de *N. reticulatus* y *Nassarius nitidus* está demostrado desde hace más de una década (Sanjuán et al. 1997), esta distinción no se ha incorporado a los estudios de biomonitorización de organoestánicos hasta fechas muy recientes (Pavoni et al. 2007, Rodríguez et al. 2008). Así, la distinción de ambas especies puede ser especialmente relevante en estudios de biomonitorización que incluyan estuarios de la fachada atlántica europea y costas mediterráneas de la Península Ibérica, donde ambas especies pueden aparecer en simpatria. Estudios recientes de nuestro grupo de investigación, todavía no publicados, sugieren que *N. nitidus* podría tener una presencia y abundancia en la zona interna de muchas rías gallegas mayor de lo anticipado. Existe incluso la posibilidad de que la presencia y abundancia actuales en nuestras rías se haya visto facilitada por la acción directa o indirecta del hombre. En este sentido, llama la atención que desde el año 2001 ambas especies hayan experimentado a lo largo de las costas holandesas una llamativa y gradual proliferación en abundancia y en superficie habitada, que contrasta con la ausencia de registros en años anteriores (entre 1995 y 2000, las campañas anuales del *Netherlands Institute for Fisheries Research* sólo encontraron 1 ejemplar en el puerto de Rotterdam; Craeymeersch & Rietveld 2005). Las causas de este cambio aún no han sido establecidas; no obstante, los autores de estas observaciones especulan con una posible influencia del calentamiento de las aguas inducido por el cambio global, al haber observado que *N. reticulatus* no sólo ha aumentado su abundancia sino que ha ampliado su rango de distribución 200 km hacia el norte penetrando en lo que había sido territorio exclusivo de *N. nitidus* (Dekker 2004).

Precisamente, la presencia de *Nassarius nitidus* en el Mar del Norte y en las aguas cálidas del Mediterráneo y Mar Negro presenta cierto paralelismo con lo observado en otros gasterópodos. Recientemente, Wilke & Pfenninger (2002) han descubierto que *Hydrobia acuta* presenta una subdivisión peculiar de su rango de distribución con dos subespecies en total alopatría; *H. a. acuta* en el Mediterráneo e *H. a. neglecta* en el Mar del Norte. Ambas subespecies estarían aisladas por una amplísima franja de litoral habitada por un congénere críptico, *Hydrobia glyca*. Las evidencias moleculares sugieren que las dos subespecies de *H. acuta* se habrían separado hace aproximadamente unos 0.4 Ma.

Esta fragmentación del rango de distribución de *H. acuta* recuerda de algún modo el patrón de distribución de *N. nitidus* descrito por Rolán & Luque (1994). Estos autores identificaron tres morfotipos con una cierta vinculación a diferentes áreas geográficas dentro del amplio rango de esta especie. El morfotipo *mammillatus* sería principalmente mediterráneo mientras el *servaini* sería más típico de las costas atlánticas. Entre esas dos grandes zonas, y en simpatría con los morfotipos anteriores, aparecería el morfotipo *nitidus*, principalmente en las costas de la Península Ibérica desde el Golfo de Vizcaya en el Atlántico hasta el Golfo de León en el Mediterráneo. Por tanto, al igual que *H. acuta* presenta una subespecie atlántica y otra mediterránea, *N. nitidus* podría presentar morfotipos con una separación geográfica algo parecida. De hecho, nuestros datos moleculares sugieren que podría existir cierto grado de diferenciación entre las poblaciones atlánticas y mediterráneas de esta especie, si bien la información disponible es todavía insuficiente como para alcanzar ninguna conclusión. Sería interesante comprobar si dicha diferenciación se confirma y, así mismo, estimar el posible tiempo de divergencia entre ambas regiones geográficas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avice JC (1994) Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall, New York
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48
- Besansky NJ (1999) Complexities in the analysis of cryptic taxa within the genus *Anopheles*. *Parassitologia* 41: 97-100
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, NG PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2006) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol* 22: 148-155
- Borsa P (2002) Allozyme, mitochondrial-DNA, and morphometric variability indicate cryptic species of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Biol J Linn Soc* 75: 261-269
- Carvajal - Rodríguez A, Guerra - Varela J, Fernández B, Rolán E, Rolán - Álvarez E (2006) An example of the application of geometric morphometric tools to the morphological diagnosis of two sibling species in *Nassarius* (Mollusca, Prosobranchia). *Iberus* 24: 81-88
- Collin R (2000) Phylogeny of the *Crepidula plana* (Gastropoda: Calyptraeidae) cryptic species complex in North America. *Can J Zool* 78: 1500-1514
- Collyer DM (1961) Differences revealed by paper partition chromatography between the gastropod *Nassarius reticulatus* (L.) and specimens believed to be *N. nitida* (Jeffreys). *J Mar Biol Ass UK* 41: 683-693
- Craeymeersch J, Rietveld M (2005) Dog whelks in Dutch coastal waters. *MarBEF Newsletter Autumn* 2005: 23-24
- Dekker H (2004) The netted dog whelk and its sibling, *Nassarius reticulatus* and *N. nitidus* (Gastropoda, Nassariidae), in the Netherlands. *Vita Malacologica* 2: 69-70
- Estoup A, Largiadere CR, Perrot E, Chourrout D (1996) Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Mol Mar Biol Biotech* 5: 295-298
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotech* 3: 294-299
- Fretter V, Graham A (1985) The prosobranch molluscs of Britain and Denmark. Part 8. Neogastropoda. *J Molluscan Stud*: 435-556
- Geller JB, Walton ED, Grosholz ED, Ruiz GM (1997) Cryptic invasions of the crab *Carcinus* detected by molecular phylogeography. *Mol Ecol* 6: 901-906
- Gili C, Marques da Silva C, Martinell J (1995) Pliocene nassariids (Mollusca: Neogastropoda) of central-west Portugal. *Tertiary Research* 15: 95-110

- Gili C, Martinell J (1994) Relationship between species longevity and larval ecology in nassariid gastropods. *Lethaia* 27: 291-299
- Haasl DM (2000) Phylogenetic relationships among nassariid gastropods. *J Paleontol* 74: 839-852
- Hajibabaei M, Smith MA, Janzen DH, Rodríguez JJ, Whitfield JB, Hebert PDN (2006) A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol Ecol Notes* 6: 959-964
- Hansson HG (1998) NEAT (North East Atlantic Taxa): Scandinavian marine Mollusca Check-List. Internet Edition, [www.tmbi.gu.se]
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond* 270: 313-321
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14812-14817
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond* 270: 1-4
- Hellberg ME, Vacquier VD (1999) Rapid evolution of fertilization selectivity and lysin cDNA sequences in teguline gastropods. *Mol Biol Evol* 16: 839-848
- Hughey JR, Silva PC, Hommersand MH (2001) Solving taxonomic and nomenclatural problems in Pacific Gigartinales (Rhodophyta) using DNA from type material. *J Phycol* 37: 1091-1109
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide-sequences. *J Mol Evol* 16: 111-120
- Knowlton N (1993) Sibling species in the sea. *Annu Rev Ecol Syst* 24: 189-216
- Knowlton N (2000) Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia* 420: 73-90
- Lobel PB, Belkade SP, Jackson SE, Longerich HP (1990) Recent taxonomic discoveries concerning the mussel *Mytilus*: implications for biomonitoring. *Arch Environ Contam Toxicol* 19: 508-512
- Marko PB (2002) Fossil calibration of molecular clocks and the divergence times of geminate species pairs separated by the Isthmus of Panama. *Mol Biol Evol* 19: 2005-2021
- Palmer ANS, Styan CA, Shearman DCA (2008) Foot mucus is a good source for non-destructive genetic sampling in Polyplacophora. *Conservation Genetics* 9: 229-231
- Pavoni B, Centanni E, Valcanover S, Fasolato M, Ceccato S, Tagliapietra D (2007) Imposex levels and concentrations of organotin compounds (TBT and its metabolites) in *Nassarius nitidus*. *Mar Pollut Bull* 55: 505-511
- Pfenninger M, Staubach S, Albrecht C, Streit B, Schwenk K (2003) Ecological and morphological differentiation among cryptic evolutionary lineages in freshwater limpets of the nominal form-group *Ancylus fluviatilis* (O.F. Müller, 1774). *Mol Ecol* 12: 2731-2745
- Robins JH, Hingston M, Matisoo-Smith E, Ross HA (2007) Identifying *Rattus* species using mitochondrial DNA. *Mol Ecol Notes* 7: 717-729
- Rodríguez JG, Belzunce MJ, Borja A, Franco J, García JI, Garmendia JM, González I, Muxika I, Sariego C, Tueros I (2008) Baseline survey of imposex and TBT concentrations in *Nassarius reticulatus* and

- N. nitidus* in the ports of Pasaia and Bilbao, Basque Country. Revista de Investigación marina 3 (XI International Symposium on Oceanography of the Bay of Biscay): 23-24
- Rolán E, Luque A (1994) *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758) y *Nassarius nitidus* (Jeffreys, 1867) (Gastropoda, Nassariidae), dos especies válidas de los mares de Europa. Iberus 12: 59-76
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19: 2496-2497
- Sanjuán A, Pérez-Losada M, Rolán E (1997) Allozyme evidence for cryptic speciation in sympatric populations of *Nassarius* spp (Mollusca: Gastropoda). J Mar Biol Ass UK 77: 773-784
- Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R (2005) Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. Phil Trans R Soc Lond B 360: 1805-1811
- Stroben E, Oehlmann J, Fioroni P (1992a) *Hinia reticulata* and *Nucella lapillus*. Comparison of two gastropod tributyltin bioindicators. Mar Biol 114: 289-296
- Stroben E, Oehlmann J, Fioroni P (1992b) The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributyltin pollution. Mar Biol 113: 625-636
- Stuart BL, Inger RF, Voris HK (2006) High level of cryptic species diversity revealed by sympatric lineages of Southeast Asian forest frogs. Biology Letters UK 2: 470-474
- Sturmbauer C, Opadiya GB, Niederstätter H, Riedmann A, Dallinger R (1999) Mitochondrial DNA reveals cryptic oligochaete species differing in cadmium resistance. Mol Biol Evol 16: 967-974
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Mol Biol Evol 24: 1596-1599
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 25: 4876-4882
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques 10: 506-513
- Wang J, Levy M, Dunkle LD (1998) Sibling species of *Cercospora* associated with gray leaf spot of maize. Phytopathology 88: 1269-1275
- Wilke T, Pfenninger M (2002) Separating historic events from recurrent processes in cryptic species: phylogeography of mud snails (*Hydrobia* spp.). Mol Ecol 11: 1439-1451
- Wilke T, Rolán E, Davis GM (2000) The mudsnail genus *Hydrobia* s.s. in the northern Atlantic and western Mediterranean: a phylogenetic hypothesis. Mar Biol 137: 827-833
- Wood AR, Apte S, MacAvoy ES, Gardner JPA (2007) A molecular phylogeny of the marine mussel genus *Perna* (Bivalvia: Mytilidae) based on nuclear (ITS1&2) and mitochondrial (COI) DNA sequences. Mol Phylogeny Evol 44: 685-698

CONCLUSIONS



El imposex en *Nassarius reticulatus* está ampliamente extendido a lo largo del litoral gallego. Como norma, las poblaciones presentan un 100% de hembras masculinizadas. La importancia del problema no se limita sólo a la elevada presencia de imposex. Esta anomalía muestra una gran severidad en muchas de esas localidades que pone de manifiesto niveles elevados de contaminación por TBT. Pese a lo anterior, hemos detectado, por primera vez en esta área costera, un descenso claro tanto de las concentraciones tisulares del contaminante como de la severidad del imposex. La interacción de las prohibiciones de los años 1990 (Directiva 89/677/CEE) y 2003 (Directiva 2002/62/CE) parece ser la causa más probable de este declive. Nuestros resultados también corroboran la existencia de un cambio gradual de la relación entre intensidad de imposex y bioacumulación de TBT a medida que disminuyen los niveles ambientales del contaminante. Además, hemos detectado evidencias de una alteración en los patrones de bioacumulación en las zonas menos contaminadas, que podría indicar la removilización de contaminantes acumulados en el sedimento.

El análisis de patrones RAPD revela una divergencia genética moderada, aunque significativa, entre poblaciones de *Nassarius reticulatus* distribuidas a lo largo de la fachada atlántica gallega. Este hallazgo resulta un tanto inesperado en un organismo con una capacidad potencial de dispersión elevada, si bien podría atribuirse a variaciones temporales y espaciales en la composición genética de las larvas reclutadas (modelo *Chaotic Genetic Patchiness*). La Ría de Muros no restringe sustancialmente el intercambio genético con las localidades adyacentes de costa abierta aunque sí refuerza la homogeneidad genética de sus poblaciones.

Las secuencias mitocondriales del gen COI en poblaciones europeas de *Nassarius reticulatus* no detectan diferencias genéticas significativas en una escala geográfica de más de 1700 km. No obstante, la relación entre distancia genética y geográfica sugiere que el flujo genético entre poblaciones se encuentra de algún modo restringido, no pudiendo aceptarse la idea de panmixia absolu-

ta. Los resultados también evidencian la existencia de una expansión demográfica durante el penúltimo período interglacial, posiblemente a partir de un refugio en el N de la Península Ibérica. Esta información pone nuevamente de manifiesto la complejidad de la historia postglacial de los organismos marinos en el Atlántico europeo.

El análisis de secuencias mitocondriales del gen COI demuestra claramente el origen no-nativo de las poblaciones gallegas del gasterópodo *Cyclope neritea*. La reciente proliferación de la especie en Galicia es consecuencia de varias introducciones independientes. El vector más probable de introducciones sería el transporte accidental con bivalvos comerciales desde la región del Véneto en Italia. También hemos constatado y descrito el desarrollo de órganos sexuales masculinos en las hembras de esta especie ante la contaminación por TBT (*i.e.* imposex).

Las secuencias parciales del gen COI permiten diferenciar de manera inequívoca dos especies crípticas del género *Nassarius*: *Nassarius reticulatus* y *Nassarius nitidus*. Proponemos el uso de los productos de digestión de este gen con la enzima de restricción *Ddel* como herramienta para el diagnóstico firme de ambas especies.

A N E X O S



1. LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A: Adenina

ADN: Ácido desoxiribonucleico

AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*

AIC: *Akaike Information Criterion*

AMOVA: Análisis de la Varianza Molecular

ANOVA: Análisis de la Varianza

AOS: *Average Oviduct Stage*

AP-PCR: *Arbitrarily Primed PCR*

ARN: Ácido ribonucleico

BCR: *Bureau of Community References*

BDI: *Butyltin Degradation Index*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BP: *Befote Present*

bp: *base pair*

BTs: Butilestánicos

C: Citosina

cm: centímetros

CBOL: *Consortium for the Barcoding of Life*

COI: Citocromo c Oxidasa Subunidad I

CRM: *Certified Reference Material*

°C: grados Celsius

DBT: Dibutilo de estaño

dNMP: Dideoxiribonucleótidos

dNTP: Desoxiribonucleótidos

e.g.: *exempli gratia*

et al.: *et alia*

Exo: *Exonuclease I*

Fig.: Figura

G: Guanina

g: gramos

g: constante de fuerza de la gravedad

GC-AED: *Gas Chromatography-Atomic Emission Detector*

gl: grados de libertad

H: Estadístico del test de Kruskal-Wallis

H:

hLRT: *hierarchical Likelihood Ratio Test*

hr: horas

H-W: Hardy-Weinberg

IC: Intervalo de Confianza

i.e.: *id est*

IMO: *International Maritime Organization*

kg: kilogramo

km: kilómetro

L.: *Linnaeus*

l: litros

LCABIE: *Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement*

M: Molar

m: metros

Ma: Millones de años

MBT: Monobutilo de estaño

MEPC: *Marine Environment Protection Committee*

mg: miligramos

min: minutos

MJ: *Median Joining*

ml: mililitros

mm: milímetros

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MST: *Minimum Spanning Tree*

μl: microlitros

μM: micromolar

μg: microgramos

n: tamaño muestral

ng: nanogramos

nm: nanómetros

NMDS: *Non-Metric Multidimensional Scaling*

NO: Noroeste

obs. pers.: observación personal

OLS: *Ordinary Least Squares*

OSPAR: Comisión Oslo-París

OTUs: *Operational Taxonomic Units*

P: Probabilidad

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PS: Peso Seco

ppb: partes por billón

r: coeficiente de correlación

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RMA: *Reduced Major Axis*

RPLI: *Relative Penis Length Index*

RPSI: *Relative Penis Size Index*

rRNA: Ácido ribonucleico ribosómico

RSD: *Relative Standard Deviation*

s: segundos

SAP: *Shrimp Alkaline Phosphatase*

SD: *Standard Deviation*

SE: Sureste

spp.: *species pluris*

SSCP: *Single Strand Conformation Polymorphism*

T: Timina

Tª: Temperatura

Taq: *Thermus aquaticus*

TBE: Tampón tris-borato EDTA

TBT: Tributilo de estaño

Tm: Temperatura de fusión

™: *Trade Mark*

TPhT: Trifenilo de estaño

tRNA: Ácido ribonucleico transferente

U: Unidades de actividad enzimática

UPGMA: *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Means*

US-EPA: *United States Environmental Protection Agency*

V: Voltios

VDSI: *Vas Deferens Sequence Index*

vs.: *versus*



2. ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla 1.- Biología y ecología de <i>Nassarius reticulatus</i>. Clasificación taxonómica de la especie	37
--	-----------

CAPÍTULO 1

Tabla 1.- Incidencia del parasitismo y proporción de sexos. Nombre de las localidades estudiadas; tipo de localidad atendiendo a la presencia de puertos importantes (FR: fuera de ría, SPI: dentro de ría sin puertos importantes, PI: dentro de ría con puertos importantes); coordenadas geográficas (latitud N y longitud O); y número total de individuos examinados (n), individuos parasitados (n_p), hembras (F) y machos (M)	82-83
--	--------------

Tabla 2.- Niveles de imposex. Porcentaje de hembras afectadas en cada localidad (%I); valores obtenidos para los tres índices de imposex (RPLI, VDSI y AOS); y porcentaje de hembras con cápsulas abortadas (%Fest)	88-89
--	--------------

Tabla 3.- Niveles de butilestánicos (BTs) en tejidos. Concentración media de estannanos (ng Sn/g PS) en tejidos de hembras de <i>Nassarius reticulatus</i>	91
---	-----------

Tabla 4.- Relación entre los índices biológicos y la contaminación. Relación entre concentración de TBT en tejidos (ng Sn/g PS) y nivel de imposex observado en las poblaciones (RPLI, VDSI y AOS). SC: suma de cuadrados, gl: grados de libertad, r: coeficiente de correlación	95
---	-----------

Tabla 5.- Imposex y niveles de butilestánicos (BTs) en la costa gallega: variación temporal. Comparaciones temporales de los niveles de imposex (RPLI); concentraciones tisulares de butilestánicos (TBT, DBT, MBT y Σ BTs; ng Sn/g PS); e Índice de Degradación de Butilestánicos ($BDI = [DBT + MBT] / TBT$, ver texto) entre los años 2000 y 2005 para 25 localidades comunes. nq: no cuantificable (para los cálculos oportunos se utilizó el valor de la mitad de su límite de cuantificación; puesto que dicho límite de cuantificación para el catión MBT en el año 2000 fue de 7.5-8, se empleó el valor de 4)	99
--	-----------

CAPÍTULO 2

Tabla 1.- Escala geográfica del estudio y recogida de las muestras. Nombre y código de las localidades estudiadas, tipo de localidad (costa abierta vs. ría), tamaño muestral (n) y longitud media de la concha de los individuos seleccionados (L)	131
--	------------

Tabla 2.- Perfiles RAPD en <i>Nassarius reticulatus</i>. Código y secuencia de los cebadores analizados, nº de marcadores totales, porcentaje de marcadores polimórficos y rango de tamaños de los productos obtenidos	146
---	------------

Tabla 3.- Diversidad genética. Estimaciones de diversidad genética en 11 poblaciones de <i>Nassarius reticulatus</i> . n: tamaño muestral	
--	--

(* denota que $n=19$ para el cebador OPQ-13); T: nº total de bandas; P (%P): nº (y porcentaje) de bandas polimórficas; H_d : diversidad de Shannon y h : diversidad génica esperada147

Tabla 4.- Diferenciación genética y estructura de poblaciones. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para 11 poblaciones de *Nassarius reticulatus*. La varianza se dividió en 3 categorías o fuentes de variación: entre grupos, entre poblaciones dentro de los grupos y entre individuos dentro de las poblaciones. Además, en cada grupo se analizó de modo independiente la varianza dentro y entre sus poblaciones. Abreviaturas: gl (grados de libertad), SC (suma de cuadrados), P (probabilidad de obtener por azar una componente más extrema)149

Tabla 5.- Diferenciación genética y estructura de poblaciones. Matriz de valores *pairwise* Φ_{ST} (diagonal inferior) y respectivos p -valores (diagonal superior). Los valores en negrita son significativos para un nivel de confianza del 95% tras la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Códigos de las localidades como en la Tabla 1150

Tabla 6.- Diferenciación genética y estructura de poblaciones. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) tras excluir la localidad de A Garda del conjunto de datos. Abreviaturas: gl (grados de libertad), SC (suma de cuadrados), P (probabilidad de obtener por azar una componente más extrema)150

CAPÍTULO 3

Tabla 1.- Escala geográfica del estudio y muestreo. Coordenadas geográficas y tamaño muestral (n) de las localidades estudiadas173

Tabla 2.- Amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Nombre de los cebadores utilizados, secuencia de los mismos y tamaño del producto obtenido; 1490 y 2198 corresponden a los cebadores universales previamente descritos (Folmer et al. 1994); NasF y NasR son cebadores internos a los anteriores, diseñados en este estudio para la amplificación específica de un fragmento del gen COI en *Nassarius reticulatus*177

Tabla 3.- Diversidad genética. Frecuencias haplotípicas en 6 poblaciones atlánticas de *Nassarius reticulatus*; H1-H10 representan aquellos haplotipos presentes en dos o más poblaciones; H_u es la frecuencia acumulada de los haplotipos encontrados en un único individuo187

Tabla 4.- Diversidad genética. Estimaciones de diversidad genética en 6 poblaciones atlánticas de *Nassarius reticulatus*. S: número de posiciones polimórficas; Ht: número de haplotipos totales; H_u : número de haplotipos únicos; π (desviación típica): diversidad nucleotídica; H_d (desviación típica): diversidad haplotípica188

Tabla 5.- Diversidad genética. Relación entre diversidad genética (Ht, H_u , H_d , π y S) y latitud (lat) en 6 poblaciones de *Nassarius reticulatus*. SC (suma de cuadrados), gl (grados de libertad), r (coeficiente de correlación)188

Tabla 6.- Diferenciación genética y estructura geográfica. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) en 6 poblaciones atlánticas de *Nassarius reticulatus*; gl (grados de libertad), SC (suma de cuadrados), P (probabilidad de obtener por azar una componente más extrema), Φ_{ST} (índice de fijación análogo a F_{ST})189

Tabla 7.- Diferenciación genética y estructura geográfica. Estadísticos Φ_{ST} y estimaciones de divergencia en 6 poblaciones atlánticas de *Nassarius reticulatus*: número medio de diferencias entre poblaciones sobre la diagonal, número medio de diferencias

dentro de las poblaciones en la diagonal y estadísticos Φ_{ST} bajo la diagonal190

Tabla 8.- Diferenciación genética y estructura geográfica. Regresiones entre las matrices de distancias genéticas (DISTGEN) y las matrices de distancias geográficas (DISTGEO); DISTGEN* indica que los valores Φ_{ST} negativos fueron considerados iguales a cero; a y b corresponden a los parámetros de la ecuación $x = a + by$, donde x es la distancia genética e y es la distancia geográfica; r es el coeficiente de correlación; los p -valores se obtuvieron tras 10000 permutaciones aleatorias191

Tabla 9.- Demografía histórica. Intervalos de confianza (IC) del parámetro τ de la distribución *mismatch* y de las correspondientes estimas del tiempo transcurrido desde la expansión (T , en años)194

CAPÍTULO 4

Tabla 1.- Incidencia del imposex. Valores registrados en las localidades estudiadas para: la proporción de sexos (M:F), el porcentaje de hembras afectadas (%I), el Índice de la Longitud Relativa del Pene (RPLI), el Índice de la Secuencia del Vaso Deferente (VDSI), el Índice del Grado de Convolución del Oviducto (AOS) y el porcentaje de hembras estériles (%EST)224

Tabla 2.- Diversidad genética. n : tamaño muestral; S : número de posiciones polimórficas; H : número de haplotipos; H_d (SD): diversidad haplotípica (desviación típica); π (SD): diversidad nucleotídica (desviación típica)228

Tabla 3.- Composición haplotípica y estructura genética. Diferenciación genética en términos de los estadísticos *pairwise* Φ_{ST} ; los valores de significación están basados en 10000 permutaciones: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 231

CAPÍTULO 5

Tabla 1.- Diferencias conculológicas entre *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758) y *Nassarius nitidus* (Jeffreys, 1867). Adaptado de Rolán & Luque (1994)246

Tabla 2.- Variación intra e interespecífica. Comparación de estimas de diversidad genética en dos especies del género *Nassarius*: número de lugares polimórficos (S), número total de haplotipos (Ht), número de haplotipos únicos (Hu) e índices de diversidad haplotípica (H_d) y nucleotídica (π)253



3. ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

- Figura 1.-** Secuencia histórica de las perturbaciones humanas sobre ecosistemas marinos. Adaptado de Jackson et al. (2001)6
- Figura 2.- ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD).** La línea gruesa representa el ADN molde. Las flechas indican los lugares de hibridación del cebador y la dirección en la cuál ocurre la síntesis del ADN. En el individuo A existen 6 lugares para la hibridación del cebador, no obstante, únicamente se amplificarán dos productos (aquellos situados entre los lugares 2-5 y 3-4). En el caso del individuo B, donde la diana 4 ha desaparecido, la amplificación sólo procederá para la región comprendida entre los lugares 2 y 512
- Figura 3.- Los daños colaterales del TBT.** Conchas de *Crassostrea gigas*: (a) individuo normal; (b) individuo mostrando anomalías en la calcificación22
- Figura 4.- Primeras observaciones acerca del imposex.** Estadios de desarrollo del imposex en *Nucella lapillus* (Gibbs & Bryan 1986): (a) macho; (b) hembra mostrando un estadio intermedio de imposex; (c) hembra mostrando un estadio final de imposex. Abreviaturas: a (ano), gc (glándula de la cápsula), p (pene), pg (papila genital), pr (próstata), r (recto) y vd (vaso deferente)24
- Figura 5.- Primeras observaciones acerca del imposex.** Consecuencias del imposex en especies donde tracto genital masculino y femenino presentan idéntica disposición dentro de la cavidad del manto. Abreviaturas: apertura de la próstata (ap), glándula de la cápsula (gc), pene (p), próstata (pr), recto (r) y vaso deferente (vd). Adaptado de Gibbs & Bryan (1996)26
- Figura 6.- El imposex y la biomonitorización de la contaminación por TBT.** Estadios de desarrollo del imposex en *Nucella lapillus* (Gibbs et al. 1987). Abreviaturas: a (ano), ca (cápsulas abortadas), gc (glándula de la cápsula), p (pene), pg (papila genital), v (vulva) y vd (vaso deferente)29
- Figura 7.- Biología y ecología de *Nassarius reticulatus*.** Aspecto general de la concha de un individuo adulto38
- Figura 8.- Biología y ecología de *Nassarius reticulatus*.** Anatomía interna de un individuo adulto: vista lateral derecha (a) e izquierda (b) tras retirar la concha. Abreviaturas: aurícula (au), boca (b), *ctnidium* (ct), estómago (e), glándula digestiva (gd), glándula hipobranquial (gh), ganglio sifonal (gs), ganglio visceral (gv), intestino (i), límite del manto (lm), músculo columelar (mc), ojo (o), opérculo (op), osfradio (os), pene (p), pie (pi), recto (r), riñón (ri), sifón (s), tentáculo (t), ventrículo (v), vaso branquial eferente (vbe), vaso deferente (vd) (Fretter & Graham 1994)39
- Figura 9.- Biología y ecología de *Nassarius reticulatus*.** Aspecto general de una larva con 40 días de vida (Fretter & Graham

1994). Abreviaturas: estatocisto (es), opérculo (op), pico de la concha (pc), pigmento en la suela del pie (pp), pigmento en el borde del velo (pv) y tubo sifonal (ts) 41

CAPÍTULO 1

Figura 1.- Escala geográfica del estudio y recogida de las muestras. Situación de las poblaciones estudiadas a lo largo de la costa gallega. (1) Foz, (2) Burela, (3) San Cibrao, (4) Viveiro, (5) O Barqueiro, (6) Cariño, (7) Cedeira, (8) Cabo Prior, (9) O Seixo, (10) Maniños, (11) Mugardos, (12) Centroña, (13) Sada, (14) Veigue, (15) Arnela, (16) Mera, (17) Sta. Cruz, (18) Sta. Cristina, (19) Oza, (20) San Antón, (21) Malpica, (22) Camelle, (23) Camariñas, (24) Muxía, (25) Nemiña, (26) Fisterra, (27) Ézaro, (28) Fogareiro, (29) Muros, (30) Creio, (31) Freixo, (32) Batuda, (33) Marmullo, (34) Ribeira, (35) Rianxo, (36) Vilagarcía, (37) Cambados, (38) A Toxa, (39) Sanxenxo, (40) Poio, (41) Marín, (42) Cangas, (43) Rande, (44) Bouzas, (45) Samil, (46) Canido75

Figura 2.- Evaluación del imposex. Medida de la longitud (h) y apertura (a) de la concha en *Nassarius reticulatus*76

Figura 3.- Incidencia del parasitismo y proporción de sexos. Diagramas de cajas para los porcentajes de hembras y machos en las 46 localidades estudiadas. Simbología: + media y - mediana81

Figura 4.- Niveles de imposex. Diagramas de frecuencias mostrando los valores de los tres índices de imposex en las localidades estudiadas. El color rojo indica aquellas poblaciones donde fueron encontradas hembras con cápsulas abortadas. Las poblaciones se encuentran ordenadas en dirección NO-SE84

Figura 5.- Niveles de imposex. Frecuencia absoluta de las localidades estudiadas atendiendo a su valor de VDSI. Clase 0: VDSI=0, clase 1: $0 < \text{VDSI} < 1$, clase 2: $1 < \text{VDSI} < 2$, clase 3: $2 < \text{VDSI} < 3$, clase 4: $3 < \text{VDSI} < 4$, clase 5: $4 < \text{VDSI} < 4.5$ y clase 6: $\text{VDSI} = 4.5$ 85

Figura 6.- Niveles de imposex. Relación entre el Índice de la Secuencia del Vaso Deferente (VDSI) y el Índice de la Longitud Relativa del Pene (RPLI). Ver texto para más detalles y significación del modelo86

Figura 7.- Niveles de imposex. Frecuencia relativa de los estadios del Grado de Convulsión del Oviducto (estadios OS) observada para cada estadio de la Secuencia del Vaso Deferente (estadios VDS)87

Figura 8.- Niveles de butilestánicos (BTs) en tejidos. Situación de las poblaciones para las cuáles se cuantificó la concentración de organoestánicos en tejidos y niveles obtenidos de los mismos. (8) Cabo Prior, (10) Maniños, (11) Mugardos, (13) Sada, (14) Veigue, (16) Mera, (18) Sta. Cristina, (19) Oza, (20) San Antón, (21) Malpica, (28) Fogareiro, (29) Muros, (30) Creio, (31) Freixo, (33) Marmullo, (34) Ribeira, (35) Rianxo, (36) Vilagarcía, (38) A Toxa, (39) Sanxenxo, (40) Poio, (41) Marín, (42) Cangas, (43) Rande, (44) Bouzas, (45) Samil, (46) Canido90

Figura 9.- Relación entre los índices biológicos y la contaminación. Concentración de TBT en tejidos de hembras versus (a) Índice de la Longitud Relativa del Pene (RPLI), (b) Índice de la Secuencia del Vaso Deferente (VDSI) y (c) Índice del Grado de Convulsión del Oviducto (AOS). Ver Tabla 4 para más detalles y significación de los modelos94

Figura 10.- Imposex y tributilo de estaño (TBT) en la costa gallega: variación espacial. Diagramas de cajas para los índices de imposex (RPLI, VDSI y AOS) y concentración tisular de TBT tras agrupar las localidades en tres categorías: FR (localidades situadas fuera de ría), SPI (localidades situadas en rías que carecen de puertos importantes) y PI (localidades situadas en rías con

puertos importantes). Simbología: + media, - mediana, \square valor atípico que dista 1.5-3 veces el rango intercuartílico y \boxtimes valor atípico que dista más de 3 veces el rango intercuartílico97

Figura 11.- Imposex. Valores de RPLI en los años 2000 y 2005 para 25 localidades comunes. La línea une puntos de igual magnitud para las dos series temporales100

Figura 12.- Butilestánicos (BTs). Concentraciones medias de estannanos en los años 2000 y 2005 para 25 localidades comunes: (a) TBT, (b) DBT y (c) MBT. Cada línea une puntos de igual magnitud para las dos series temporales en cuestión101

Figura 13.- Butilestánicos (BTs). Diagrama de dispersión mostrando para cada localidad estudiada los valores de BDI y concentración tisular de TBT en las dos series temporales (25 localidades comunes)103

Figura 14.- Butilestánicos (BTs). Diagramas de cajas de los valores de BDI en 7 localidades comunes para los años 1998, 2000 y 2005. Simbología: + media y - mediana103

Figura 15.- Relación imposex - tributilo de estaño (TBT). Concentración de TBT en tejidos de hembras versus Índice de la Longitud Relativa del Pene (RPLI) en 26 (año 2000) y 26 (año 2005) localidades de la costa gallega (24 comunes)104

Figura 16.- Relación imposex - tributilo de estaño (TBT). Concentración de TBT en tejidos de hembras versus Índice de la Longitud Relativa del Pene (RPLI) en 13 (año 1998-1999) y 26 (años 2000 y 2005) localidades de la costa gallega (7 comunes)105

CAPÍTULO 2

Figura 1.- Escala geográfica del estudio y recogida de las muestras. Situación de las localidades estudiadas a lo largo de la costa gallega132

Figura 2.- Perfiles RAPD en *Nassarius reticulatus*. Resultados obtenidos para 17 individuos de una misma localidad a partir de una amplificación típica con el cebador OPQ-15. L: marcador de pesos moleculares; OPQ15-395 y OPQ15-374: marcadores monomórficos; OPQ15-357: marcador polimórfico presente en los individuos 4 y 5; OPQ15-187: marcador polimórfico presente en el individuo 15145

Figura 3.- Diferenciación genética y estructura de poblaciones. Diferencias entre las poblaciones estudiadas ($P < 0.0001$) en la frecuencia de cuatro marcadores: (a) OPQ14-139, (b) OPQ14-248, (c) OPQ14-279 y (d) OPQ15-800148

Figura 4.- Diferenciación genética y estructura de poblaciones. Diagrama de Escalamiento Multidimensional no Métrico en dos dimensiones para 11 poblaciones de *Nassarius reticulatus*. El análisis se llevó a cabo atendiendo a las distancias genéticas (distancia de Prevosti). Códigos de las poblaciones como en Tabla 1; los puntos rellenos denotan localidades de costa abierta mientras que los puntos vacíos indican aquellas situadas en el interior de ría151

Figura 5.- Diferenciación genética y estructura de poblaciones. Dendograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Prevosti para 11 poblaciones de *Nassarius reticulatus*. Los números en los nodos representan aquellos valores de *bootstrap* $> 50\%$ (1000 pseudoréplicas)152

Figura 6.- Diferenciación genética y estructura de poblaciones. Representación gráfica de la asociación entre la matriz de distancias genéticas (estadísticos Φ_{ST}) y la matriz de distancias geográficas153

CAPÍTULO 3

- Figura 1.- Escala geográfica del estudio y muestreo.** Situación de las localidades estudiadas a lo largo de la costa atlántica europea174
- Figura 2.- Diversidad genética.** Representaciones gráficas para la relación diversidad genética (diversidad nucleotídica, π , y número de lugares polimórficos, S) vs. latitud en 6 poblaciones atlánticas de *Nassarius reticulatus*189
- Figura 3.- Diferenciación genética y estructura geográfica.** Representación gráfica de la asociación entre la matriz de distancias genéticas (estadísticos *pairwise* Φ_{ST}) y la matriz de distancias geográficas191
- Figura 4.- Diferenciación genética y estructura geográfica.** Red haplotípica ilustrando las relaciones evolutivas entre las secuencias COI observadas. Cada haplotipo es representado por un círculo y su área es proporcional al número de individuos en los cuáles el haplotipo fue hallado; los haplotipos compartidos son representados como diagramas de frecuencias. Los números corresponden a las posiciones mutacionales en el fragmento estudiado (395 bp)192
- Figura 5.- Demografía histórica.** Representación gráfica de las distribuciones *mismatch* observada y esperada bajo el modelo de expansión súbita193

CAPÍTULO 4

- Figura 1.- Escala geográfica del estudio y recogida de las muestras.** Situación de las localidades estudiadas en la costa atlántica gallega; VI: Vilagarcía y TX: A Toxa (Ría de Arousa), PO: Poio (Ría de Pontevedra). El rango nativo de la especie es indicado con color verde; el color púrpura denota la región del atlántico francés donde se han detectado poblaciones de la especie desde la década de 1970218
- Figura 2.- Contaminación por tributilo de estaño (TBT) e imposex en *Cyclope neritea*.** Medida de la longitud (l), apertura (a) y altura (h) de la concha219
- Figura 3.- Características del imposex.** Vista dorsal de la cavidad del manto de una hembra estéril encontrada en la localidad de Poio. Abreviaturas: ca (cápsulas abortadas), gc (glándula de la cápsula), p (pene), pi (pie) y td (tentáculo derecho)223
- Figura 4.- Incidencia del imposex.** Frecuencia relativa de los distintos estadios de VDS en las poblaciones estudiadas: (a) A Toxa, (b) Vilagarcía y (c) Poio225
- Figura 5.- Incidencia del imposex.** Distribución de frecuencias de la longitud del pene de machos y hembras en las poblaciones estudiadas: (a) A Toxa, (b) Vilagarcía y (c) Poio226
- Figura 6.- Incidencia del imposex.** Frecuencia relativa de los estadios del Grado de Convolución del Oviducto (estadios OS) observada para cada estadio de la Secuencia del Vaso Deferente (estadios VDS)227
- Figura 7.- Composición haplotípica y estructura genética.** Frecuencias haplotípicas registradas por Simon-Bouhet et al. (2006) en (a) poblaciones nativas de la especie (costa mediterránea, sur de la Península Ibérica y sur del Golfo de Vizcaya) y (b) poblaciones de procedencia conflictiva a lo largo de la costa atlántica francesa; (c): frecuencias haplotípicas registradas en el presente trabajo para la costa atlántica gallega229

Figura 8. Composición haplotípica y estructura genética. Relaciones genealógicas entre los haplotipos registrados para *Cychope neritea*: H1-H29 (Simon-Bouhet et al. 2006); H30-H39 (Simon-Bouhet et al. *unpublished*); G1-G2 (nuevas secuencias halladas en el presente trabajo). Los haplotipos presentes en las poblaciones gallegas son resaltados en color rojo230

CAPÍTULO 5

Figura 1.- Morfología típica de la concha en *Nassarius nitidus* (a-c) y *Nassarius reticulatus* (d-f); (g-h) muestran rasgos característicos de las dos especies247

Figura 2.- Rango geográfico de distribución de *Nassarius reticulatus* s.s. y *Nassarius nitidus* según Rolán & Luque (1994)248

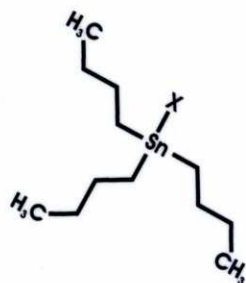
Figura 3.- Variación intra e interespecífica. Red haplotípica ilustrando las relaciones evolutivas entre las distintas secuencias COI registradas en *Nassarius nitidus*. Cada haplotipo es representado por un círculo y su área es proporcional al número de individuos en los cuáles el haplotipo fue hallado; los haplotipos compartidos son representados como diagramas de frecuencias. Los números en rojo corresponden a las posiciones mutacionales en el fragmento estudiado (395 bp)254

Figura 4.- Variación intra e interespecífica. Diferencias entre los haplotipos registrados en *Nassarius reticulatus* (nasret_h1-nasret_h37) y *Nassarius nitidus* (nasnit_h1-nasnit_h21). Únicamente se indican las posiciones polimórficas en el fragmento estudiado (395 bp)255

Figura 5.- Variación intra e interespecífica. Distribución de frecuencias del número de diferencias nucleotídicas existente entre pares de haplotipos (1596 comparaciones)256

Figura 6.- Lugares de restricción diagnóstico. Alineamiento de las secuencias consenso de *Nassarius reticulatus* (nasret) y *Nassarius nitidus* (nasnit) mostrando el fragmento de reconocimiento y corte de la enzima de restricción DdeI (CTNAG)257





UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Servicio de Bibliotecas



1700787865